

Лебедева Марина Валерьевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ТОПОЛЕЙ
(*POPULUS SSP.*) В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ЗАПАДА РФ**

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2022

Работа выполнена на кафедре Почвоведения и лесных культур Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова», г. Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Потокина Елена Кирилловна,
профессор кафедры лесных культур,
директор Центра биоинформатики и
геномных исследований СПбГЛТУ

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
Родионов Александр Викентьевич,
профессор, заведующий лабораторией
биосистематики и цитологии Ботанического
института В. Л. Комарова Российской
академии наук

кандидат биологических наук,
Павличенко Василий Валерьевич,
старший научный сотрудник лаборатории
физиологической генетики Сибирского
института физиологии и биохимии
растений Сибирского отделения
Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Воронежский
государственный лесотехнический
университет имени Г.Ф. Морозова», г.
Воронеж

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.088.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31, e-mail: aspirantura@vigg.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Тополь (*Populus ssp.*) является наиболее популярной мелколиственной породой для плантационного лесовыращивания в России и других странах, благодаря своему быстрому росту, возможности вегетативного размножения и относительной неприхотливости. Плантации тополя имеют важное экономическое значение как источник древесины, которая используется в целлюлозно-бумажной и лесоперерабатывающей промышленности. Древесина тополя рассматривается как возможное сырьё для производства этанола и биотоплива. Виды рода *Populus* используются для рекультивации и биоремедиации нарушенных земель. Кроме того, в тополевых насаждениях быстрое увеличение биомассы эффективно снижает количество углекислого газа в атмосфере, что препятствует глобальному потеплению.

Ещё в 1947 году была создана международная ассоциация (International Poplar Commission) для координации программ по изучению и сохранения генетических ресурсов *Populus*, объединяющая 35 стран-участников. На сегодняшний день селекция сортов и получение гетерозисных гибридных клонов тополя и осины являются стратегической задачей долгосрочных селекционных программ Германии, Франции, Италии, США, Аргентине, Турции и Китае уже на протяжении многих лет. Только в Китае площади плантаций тополя к 2018 году превысили 9 млн га. Это стало возможным в результате выведения новых, высокопродуктивных, устойчивых к заболеваниям гибридных клонов. Мировой лидер в области селекции гибридных тополей – корпорация GreenWood Resources (США) ежегодно тестирует более тысячи гетерозисных клонов на предмет эффективности для коммерческого использования.

Большинство существующих на сегодняшний день лесосырьевых плантаций созданы с использованием видов секций *Aegiros* и *Takamahaka*, которым посвящено большинство селекционных работ и экспериментов по скрещиванию тополей. Показательно, что даже в качестве модельного объекта для секвенирования генома древесного вида был выбран североамериканский вид *P. trichocarpa*.

В Восточном полушарии, в частности, на территории Российской Федерации, преобладающим видом *Populus* является *P. tremula* L. – осина обыкновенная (секция *Populus*). Этот морозоустойчивый и продуктивный вид, способный успешно произрастать на бедных, часто закисленных почвах, отличается огромным внутривидовым разнообразием, и легко скрещивается с другими видами. В нашей стране работы по селекции клонов осин и получению гетерозисных гибридов ведутся с 30-ых годов прошлого века. Проблема заключается в том, что для большинства этих селекционных достижений точная информация о посадках или одиночных деревьях была утеряна, хотя отдельные плантации элитных клонов сохранились, и могли бы представлять большой интерес для использования и дальнейшего вовлечения в селекционный процесс. С другой стороны, для селекции тополя и осины, как и других древесных культур, характерно некоторое методологическое «отставание» по сравнению с сельскохозяйственными культурами: в России становление маркер-вспомогательной селекции осины и тополя только намечается, для ее развития не хватает исследовательского ресурса в виде информации о структуре генома и генах, контролирующих хозяйственно-ценные признаки.

Степень разработанности темы исследования

В России изучением генетического разнообразия и селекцией клонов тополей начали заниматься с начала прошлого века. Известны работы профессора Лесотехнической академии П. Л. Богданова, начатые ещё в 30-е годы. Они были нацелены на получение гетерозисных гибридов от межвидовых скрещиваний тополя. В ходе многолетних экспериментов в то время удалось получить 160 комбинаций скрещиваний с использованием 16 видов тополей разных секций. Среди полученных гибридов особо были отмечены так называемые элитные тополя – морозостойкие, быстрорастущие, с качественной древесиной. Наиболее ценные из них стали родоначальниками сортов-клонов и получили названия тополь невский (*Populus* × *newensis* Bogd.), гибрид от скрещивания *P. canadensis* Moench × *P. balsamifera* L., и тополь ленинградский (*Populus* × *leningradensis* Bogd.), гибрид от скрещивания *P. canadensis* Moench × *P. suaveolens* Fisch. Позднее их вегетативное потомство рассылалось по ботаническим садам и лесным хозяйствам для оценки их морозоустойчивости и скорости роста. Однако впоследствии селекционная работа была прервана, исходные элитные деревья погибли ещё во время блокады Ленинграда, а информация о нахождении их клонов к настоящему времени утеряна практически полностью. Однако в гербарии СПбГЛТУ сохранился аутентичный гербарий тополей невского и ленинградского, заложенный ещё самим П. Л. Богдановым. Это даёт возможность использовать молекулярно-генетические методы для идентификации клонов элитных тополей в ныне существующих посадках, путём сравнения данных их генотипирования с референсными гербарными образцами.

Известны работы школы А. Н. Яблокова и С. Н. Багаева, направленные на изучение исполинской триплоидной осины - спонтанного автополиплоида, найденного А. Н. Яблоковым в Костромской области в 40-х годах. Сотрудниками Костромской ЛОС была создана коллекция лучших клонов, характеризующихся высокими темпами роста и устойчивостью к стволковой гнили. В 1999-2000 годах лучшие клоны были переданы в коллекцию СПбНИИЛХ и введены в культуру *in vitro*. Наиболее перспективные линии были высажены на опытных участках в Сиверском лесхозе, Ленинградская область. Однако при его реорганизации схемы посадки осин были утеряны. Мониторинг роста деревьев на одном из опытных участков выявил необычайно высокие темпы роста некоторых деревьев. В этом случае использование молекулярно-генетических методов даёт возможность сравнить генотипы высаженных деревьев с родительскими генотипами, сохраняемыми в *in vitro* коллекции СПбНИИЛХ.

Существующая классификация клонов и сортов тополей базируется на 64 морфологических и фенологических признаках, что делает её трудоёмкой и весьма субъективной. Поэтому для идентификации клонов, сортов и гибридов активно разрабатывались системы молекулярных маркеров на основе AFLP, ISSR и SSR анализа. Каждый из подходов имеет преимущества и недостатки. Однако наиболее эффективными считаются микросателлитные маркеры (SSR, Single Sequence Repeats), так как являются надёжно воспроизводимыми кодоминантными маркерами, более простыми в применении, чем AFLP. В основном микросателлитные маркеры разрабатывались для тополей секций *Aigeiros* и *Tacahamasa*, но известны также работы по генотипированию тополей секций *Populus* и *Leuca*.

Цель исследования является разработка молекулярно-генетических подходов и исследовательских ресурсов для инвентаризации уже имеющихся селекционных достижений и селекции новых элитных клонов *Populus* на Северо-Западе РФ.

Задачи исследования:

1) Провести генетическую инвентаризацию сохранившихся в Северо-Западном регионе РФ тополёвых плантаций с целью выявления экземпляров тополя невского и тополя ленинградского селекции П. Л. Богданова.

2) С помощью методов молекулярного маркирования провести идентификацию клонов быстрорастущей осины, полученных от триплоидных осин селекции А. С. Яблокова, в плантациях СПбНИИЛХ в Ленинградской области.

3) В результате контролируемого скрещивания получить картирующую популяцию гибридов F1 осины, генотипировать её с использованием методов высокопроизводительного секвенирования, и заложить экспериментальную плантацию для многолетнего изучения изменчивости хозяйственно-ценных признаков.

4) По данным фенотипирования экспериментальной плантации картировать генетические локусы (QTL), сцепленные с изменчивостью показателей роста у осины.

5) По результатам QTL-анализа разработать молекулярные маркеры для использования в селекции быстрорастущих клонов.

Научная новизна.

Впервые по результатам микросателлитного анализа тополевых насаждений г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области идентифицированы клоновые посадки “тополя невского” и “тополя ленинградского” селекции П. Л. Богданова, информация о которых была утеряна. Впервые методами ДНК-фингерпринтинга проведена генетическая инвентаризация клоновых плантаций быстрорастущей триплоидной осины СПбНИИЛХ, исходный материал которых был получен от А. С. Яблокова. Впервые популяция гибридов F1 осины, полученная в результате контролируемого скрещивания, генотипирована с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования (методом RADseq). Впервые для осины создана картирующая популяция высокого разрешения, с использованием которой был идентифицирован генетический локус, сцепленный с изменчивостью показателей роста. Для выявленного локуса разработан молекулярный маркер на основе ПРЦ в реальном времени.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы состоит в расширении современных знаний о структуре генома осины (*P. tremula*), полученных в результате высокопроизводительного генотипирования популяции гибридов F1 осины и сравнения данных генотипирования видов *P. tremula* и *P. trichocarpa*, геном которого отсеквенирован (на момент выполнения работы геном *P. tremula* ещё не был опубликован). Впервые получены новые знания о генетическом контроле скорости роста осины на ранних этапах развития, выявлены генетические локусы, сцепленные с этим ценным для селекции признаком. Практическая значимость работы заключается в восстановлении утерянных селекционных достижений – элитных гибридов тополя, отличающихся морозостойкостью и скоростью роста, рекомендованных для плантационного выращивания на Северо-Западе РФ.

Методы исследования

Идентификация генотипов тополей осуществлялась с помощью стандартных методов ДНК-фингерпринтинга: выделение ДНК из листьев, ПЦР для амплификации полиморфных локусов (SSR и ISSR), электрофорез в агарозном геле для визуализации результатов ПЦР. Электрофорез в полиакриламидном геле применялся для выявления идентичных ДНК-профилей после амплификации. Для установления точного размера микросателлитных локусов использовался метод капиллярного электрофореза на QIAxcel System Capillary Electrophoresis (Qiagen, Germany) с модификациями.

Для создания картирующей популяции гибридов F1 осины было произведено скрещивание «на срезанных ветках» родительских деревьев. Семена после созревания были собраны и пророщены в контейнерах в условиях теплицы. После трёх месяцев подращивания сеянцы были пересажены в открытый грунт в трёх различных географических точках (в Ленинградской, Воронежской и Тюменской областях), с них были собраны листья для выделения ДНК. В конце вегетационного сезона измерялись высота и диаметр растений.

Для целей высокопроизводительного генотипирования популяции гибридов была использована технология генотипирования секвенированием (GBS, Genotyping By Sequencing), в частности, ее разновидность – метод RADseq (Restriction site-associated DNA sequencing). RADseq библиотека была подготовлена для родительских деревьев и 122 гибридных растений, высаженных в Ленинградской области. Библиотека была секвенирована на приборе Illumina HiSeq2500, по результатам были идентифицированы более 15 тыс. SNP, полиморфных между родительскими генотипами. По результатам генотипирования SNP-маркерами была сконструирована генетическая карта, с помощью которой был осуществлён QTL-анализ. На основе идентифицированных SNP, полиморфизм которого сцеплен с изменчивостью высоты растений, был разработан маркер на основе метода ПЦР-РВ с использованием TaqMan-зондов.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) С помощью разработанной системы на основе микросателлитных локусов (SSR) на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области идентифицированы клоновые плантации элитных сортов-клонов тополя невского и тополя ленинградского селекции П. Л. Богданова, информация о которых была утеряна.
- 2) С помощью ДНК-фингерпринтинга на основе ISSR-маркеров проведена генетическая инвентаризация и восстановлена посадочная ведомость клоновых плантаций быстрорастущей осины коллекции СПБНИИЛХ, исходный материал которых был получен от осин селекции А. С. Яблокова.
- 3) Создана картирующая популяция гибридов осины, полученных от контролируемого скрещивания родительских форм с контрастным фенотипом. Полученная популяция генотипирована методом высокопроизводительного секвенирования, в результате чего получена генетическая карта высокого разрешения. Данную популяцию и построенную карту можно использовать для многолетних исследований ассоциации изменчивости фенотипических признаков и геномного «профиля» у 122 гибридов осины, поддерживаемых в виде плантации в Ленинградской области.

- 4) По результатам морфологического анализа картирующей популяции осины на группе сцепления LG5 картирован локус (QTL), полиморфизм которого сцеплен с изменчивостью по скорости роста семян осины в первые годы развития.

Апробация результатов исследования и степень достоверности.

Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярно-генетических методов, биоинформатических и математико-статистических методов обработки данных.

Основные результаты работы были представлены на конференциях:

- 1) «Восстановление утраченных достижений в области отечественной селекции сортов-клонов тополя методом ДНК-фингерпринтинга» Лебедева М. В. // Материалы международной научно-практической конференции “Биотехнологии в комплексном развитии регионов” Москва, 15-17 марта 2016. С. 52; с. 159-160.
- 2) Genotyping of population generated by *Populus tremula* x *P. alba* cross / Lebedeva M.V., Zhigunov A.V., Ulianich P.S., Voitsekhovskii D.M., Potokina E.K., 2017 // Proceedings of the 4th International conference “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology (PlantGen2017)” Almaty, May 29 – June 02. P. 118
- 3) Анализ генетических локусов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки осины (*Populus tremula* L.) в различных географических условиях / Лебедева М.В., Кукуричкин Г.М., Потокина Е.К., Жигунов А.В. // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Сборник тезисов XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 19-20 апреля 2018, с. 148-149.
- 4) Экологические испытания серии картирующих популяций от скрещиваний разных видов *Populus* L. / Жигунов А. В., Лебедева М. В., Ульянич П.С., Потокина Е.К., 2017 // Генетика популяций: прогресс и перспективы. Материалы Международной научной конференции, посвящённой 80-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю. П. Алтухова ИОГен РАН. Звенигород, 17-21 апреля 2017. С. 99-101
- 5) Выявление SNP-маркеров и построение генетических карт высокого разрешения для *Populus tremula* L. на основе технологий высокопроизводительного секвенирования / Жигунов А. В., Ульянич П.С., Лебедева М. В., Потокина Е.К. // Материалы 5-ой международной конференции-совещания “Сохранение лесных генетических ресурсов”, Гомель. 2-7 октября 2017. 247-249с.
- 6) Development of research resources for marker-assisted selection of aspen (*Populus tremula* L.) in Russia / A.V. Zhigunov, P.S. Ulianich, M.V. Lebedeva, E.K. Potokina // German Russian Conference on Forest Genetics - Proceedings - Ahrensburg, 2017 November 21-23

Публикации результатов исследования

По материалам работы опубликовано 9 печатных работы, из них 3 - в журналах, входящих в перечень ВАК и реферируемых в базе Web of Science и Scopus, 6 – в материалах международных конференций.

Личный вклад автора

Автор диссертации являлась основным исполнителем данной работы и принимала участие в выделении ДНК, ДНК-фингерпринтинге с помощью микросателлитных и ISSR-локусов, в проведении контролируемых скрещиваний, проращивании гибридных семян и получении семян, учёте фенотипических данных гибридных семян в Ленинградской

области, приготовлении RADseq-библиотек, проведении QTL-анализа, разработке маркера на основе подхода ПЦР в реальном времени, генотипировании популяций осин в Воронежской области и Сургуте, статистической обработке полученных данных, подготовке рисунков и написании статей. Однако данная работа была выполнена благодаря вкладу многих участников соответствующих проектов. Проведение контролируемых скрещиваний и закладка гибридных плантаций проводилась под руководством проф. А.В. Жигунова. Подготовка RADseq-библиотек осуществлялась под методическим руководством членов лаборатории проф. С. В. Нуждина в Южно-Калифорнийском университете. Питер Чанг (Peter Chang) осуществил работу по первичной обработке данных секвенирования, выравниванию ридов на референсный геном и идентификации SNP. Павел Ульянич осуществлял конструирование генетической карты. Сергей Навалихин занимался сбором образцов и фенотипическим учётом популяции осин в Воронежской области. Глеб Кукуричкин участвовал в сборе образцов и фенотипическом учёте популяции гибридных осин в Сургуте. Разработка маркеров на основе подхода ПЦР в реальном времени осуществлялась с помощью сотрудников лаборатории стрессоустойчивости растений ВНИИСБ.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и включает список сокращений, использованных в работе, введение, обзор литературы по теме исследования, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который состоит из 145 источников (из них - 119 на английском языке). Диссертация содержит 21 рисунок, 8 таблиц и 7 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Обзор литературы

В диссертационной работе глава «Обзор литературы» состоит из семи разделов. В первых разделах представлена общая характеристика рода *Populus* и наиболее часто используемых видов этого рода, включая их значимость как хозяйственно-ценной породы, так и значимость как модельного объекта биологии растений. В следующих разделах описываются широко используемые системы молекулярных маркеров для разных видов рода *Populus*, а также имеющиеся на данный момент геномные ресурсы для исследования тополей. Один из разделов описывает работы, посвящённые картированию QTL-локусов у видов *Populus*. Последний раздел содержит описание состояния селекции тополей в России на момент начала работы.

Материалы и методы исследования

Выделение ДНК из листьев осуществлялось методом СТАВ с модификациями. Фрагменты свежих листьев (~100 мг) замораживали в жидком азоте, гомогенизировали с помощью шариковой мельницы и инкубировали при 65°C в течение часа в 2% СТАВ-буфере с добавлением β-меркаптоэтанола. Далее смесь два раза очищалась хлороформ-изоамиловой смесью. ДНК осаждалась изопропанолом, осадок промывался 70% этанолом, высушивался и разводился в деионизированной воде. ДНК из гербарного материала выделялась схожим образом, но перед инкубированием в СТАВ-буфере образцы промывались свежим моющим буфером, состоящим из Tris-HCl, EDTA, NaCl, β-меркаптоэтанола и PVP.

Микросателлитный анализ. Амплификация SSR локусов проводилась в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 100 нг геномной ДНК, 200 мкмоль смеси нуклеотидов (dNTPs), по 0,5 мкмоль прямого и обратного праймеров, 2,5 ед. Taq-полимеразы и 1× Taq-буфера. Амплификация осуществлялась в амплификаторе Bio-Rad iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по программе: начальная денатурация - 95°C 3 мин, 10 циклов (94°C – 30 с, 60°C – 30 с с уменьшением температуры на 0,5°C каждый цикл, 72°C – 30 с), далее 35 циклов (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с), финальная элонгация 72°C – 5 мин. Результаты ПЦР визуализировались с помощью электрофореза в агарозном геле. В случае успеха ДНК-профили, полученные с микросателлитных праймеров, анализировались с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для определения точного размера целевого ПЦР-продукта микросателлитного локуса использовался капиллярный электрофорез с модификациями, позволяющими различить фрагменты в разнице в длине 2 пн.

Вероятность случайного совпадения аллелей у неродственных организмов – probability of identity (PI) и наблюдаемая гетерозиготность (Ho) для каждого локуса вычислялись с помощью макроса Microsoft Excel GenAlEx 6.5. Генетическое расстояние между исследованными образцами тополей рассчитывалось с помощью программы DARwin 6.0.0 по алгоритму Simple matching. Далее был проведён иерархический кластерный анализ и построена UPGMA-дендрограмма.

ISSR-анализ. Амплификация ISSR локусов проводилась в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 50 нг геномной ДНК, 1x буфер (Sileks), 10 mM dNTPs, 10 пкмол праймера и 2,5 ед. Taq (Dialat, Москва). ПЦР проводилась в амплификаторе GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem, США) при следующем режиме: начальная денатурация - 5 мин при 94°C, далее 39 циклов (30 с – 94°C, 45 с – t отжига праймеров и 1 мин – 72°C), финальная элонгация - 10 мин при 72°C. Результаты ПЦР визуализировались с помощью электрофореза в агарозном геле. Генетическое расстояние между исследованными образцами тополей рассчитывалось с помощью программы DARwin 6.0.0 по алгоритму Simple matching. Далее был проведён иерархический кластерный анализ и построена UPGMA-дендрограмма.

Создание картирующей популяции осины. Для создания картирующей популяции были выбраны родительские генотипы – осины, растущие в одинаковых условиях, в Санкт-Петербурге. Скрещивание «на срезанных ветках» было проведено в апреле 2016 года. Созревшие семена были высажены во влажную почву в пластиковые контейнеры. Ещё через несколько недель (май 2016) сеянцы были пересажены в индивидуальные контейнеры и выращивались в теплице до сентября 2016 года, когда они были пересажены в открытый грунт в трёх областях: Ленинградской, Воронежской и Тюменской. Перед посадкой была измерена высота каждого растения, а также был собран материал для выделения ДНК. В мае-начале июня был проведён учёт выживших растений, а осенью, в конце вегетационного сезона, измерялись диаметр и высота саженцев.

Подготовка и секвенирование ddRADseq библиотек. ddRADseq библиотеки были подготовлены для родительских деревьев (в 8 повторностях для каждого родителя) и их потомков, сформировавших плантацию в Ленинградской области (всего 122 дерева в одной повторности) с использованием двух рестриктаз – *HindIII* и *NlaIII*. Полученные библиотеки были секвенированы на Illumina HiSeq2500 в Геномном Центре Южно-

Калифорнийского университета (Genome and Cytometry Core, University of Southern California, USC). Длина одноконцевого прочтения фрагмента (рида) составила 150 пн.

Идентификация SNP и построение генетической карты. Тримминг сырых ридов осуществлялся с помощью программы Trimmomatic v.036. Отфильтрованные риды картировались на референсный геном *P. trichocarpa* с помощью BWA MEM с параметрами по умолчанию. Полиморфизмы между родительскими деревьями идентифицировались с помощью алгоритмов пайплайна GATK. Для каждого SNP был проведён тест χ^2 для проверки их наследования в соответствии с Менделевскими расщеплениями – 1:1, 1:2:1 и 1:1:1:1 – среди потомков F1. В дальнейшем анализе использовались только те SNP, которые достоверно соответствовали Менделевскому расщеплению. Для построения женской генетической карты из отфильтрованных SNP были выбраны те, которые были гетерозиготны (ab) у материнского организма и гомозиготны у отцовского (aa). Соответственно, в популяции F1 расщепление по этим маркерам ожидалось в соотношении 1:1. Карта отцовского генотипа была построена с использованием аналогичного алгоритма, но гетерозиготными были локусы отцовского растения. Генетические карты были построены с помощью программы JoinMap 3.0.

QTL-анализ. Картирование QTL для всех признаков (высота и прикорневой диаметр деревьев в разные года) осуществлялось отдельно по отцовской и материнской генетическим картам с помощью программы Windows QTL Cartographer v.2.5. Для анализа использовался метод сложного интервального картирования (Composite Interval Mapping). Перерасчёт генетических расстояний осуществлялся с помощью функции Косамби (Kosambi mapping function) с шагом 2 сМ. Пороговый уровень значимости LOD (logarithm of odds) был рассчитан на основе пермутаций (1000 повторений при уровне значимости $p < 0,05$).

Генотипирование гибридных популяций в Воронежской области и Сургуте. Анализ SNP полиморфизма у осин F1, высаженных в Воронеже и Сургуте, проводился с помощью ПЦР-РВ с TaqMan зондами, конкурентно отжигающихся на исследуемую последовательность, и способными распознать однонуклеотидную замену. В реакционную смесь входили: ~30 нг геномной ДНК, 1 x Taq-буфер, 200 мМ dNTP, по 0,5 мМ каждого праймера и каждого зонда, 2,5 U Taq-полимеразы и деионизированная вода до объёма 25 мкл. Программа ПЦР: начальная денатурация 95°C – 3 мин, 50 циклов (95°C – 20 с, t отжига – 40 с, 72°C – 40 с). Детекция флуоресценции осуществлялась при 72°C. Оценка влияния материнского и отцовского варианта аллелей на высоту деревьев сургутской и воронежской популяций осуществлялась с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Идентификация клонов тополя невского и тополя ленинградского в посадках

Несмотря на то, что исходные образцы элитных сортов-клонов *P. × newensis* Bogd. и *P. × leningradensis* Bogd., созданные Л. П. Богдановым, погибли, в городских посадках Санкт-Петербурга, предположительно, сохранилось их вегетативное потомство. В процессе поиска клонов тополя невского и тополя ленинградского были обследованы посадки деревьев в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, где они предположительно могли сохраниться. Таким образом, были собраны образцы: 1) с плантаций, заложенных Л. П. Богдановым в разные годы в 24-ом квартале Карташевского участкового лесничества (образцы K1-K15); 2) с посадок тополей интродукционного участка СПбГЛТУ (образцы LTA1-LTA17); 3) с одиночных деревьев из парков Санкт-

Петербурга, в том числе парка СПбГЛТУ (образцы LTA18-LTA38); 4) с деревьев из дендрологической коллекции Глуховского питомника Санкт-Петербурга (образцы G1-G6); 5) образцы (A1-A12) были собраны в дендрарии СевНИИЛХ (г. Архангельск), в коллекцию которого входили задокументированные тополя селекции Л. П. Богданова. В качестве референсных генотипов для *P. × newensis* Vogd. использовался гербарный образец 1938 года сеянца из гибридной семьи № 20/5, послужившей материалом для выделения сорта-клона, и гербарный образец, вероятно, его вегетативного потомства, датированный 1966 годом. Для *P. leningradensis* Vogd. референсными генотипами послужили гербарный образец сеянца из гибридной семьи № 13/8, использовавшейся для выделения сорта-клона, а также его дубликат. Все гербарные образцы хранятся в Гербарии СПбГЛТУ (КФТА). Всего было генотипировано 75 образцов тополей по 6 микросателлитным локусам.

Электрофорез в полиакриламидном геле позволял выявить специфичный ДНК-профиль, включающий в себя как целевые фрагменты ожидаемой длины, так и нецелевые, но специфичные для генотипа (рис. 1).

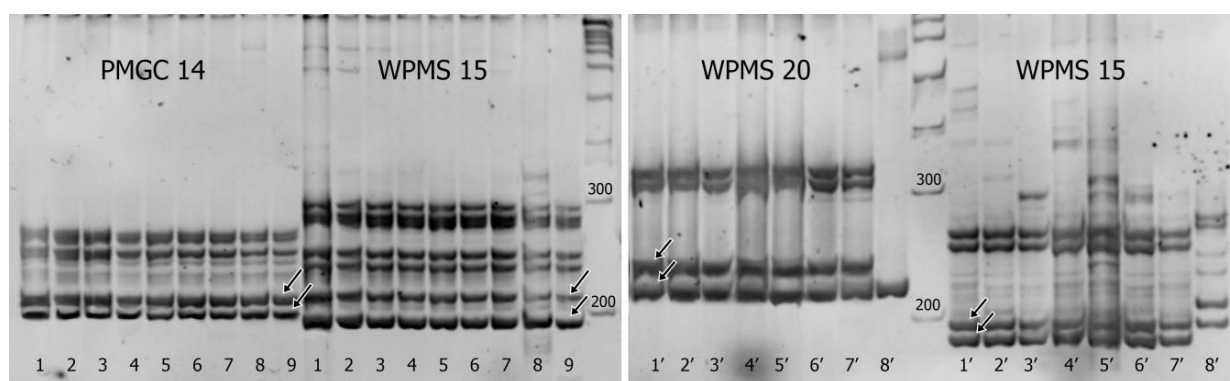


Рис. 1. Пример выявления идентичных ДНК-профилей для продуктов амплификации с SSR-праймерами WPMS20, WPMS15 и PMGC14. Образцы 1-7 – LTA12, LTA33-38 (парк СПбГЛТУ); 8-9 – гербарные образцы *P. leningradensis*. Образцы 1'-5' – К6-К10 (Карташевское лесничество); 6' – А6 (Архангельск, СевНИИЛХ); 7' – гербарный образец *P. newensis* 1966 года; 8' – гербарный образец *P. newensis* 1938 года.

Точные размеры целевых продуктов амплификации микросателлитных локусов устанавливались с помощью капиллярного электрофореза QIAxcel System Capillary Electrophoresis (Qiagen, Germany). Предел разрешения этого метода – 2-5 пн в зависимости от длины фрагмента, тогда как повторяющийся мотив многих, наиболее полиморфных, микросателлитов – 2 пн. Эта проблема была решена модификациями стандартного протокола производителя путем добавления маркеров длин, содержащих фрагменты ДНК известного размера, непосредственно в образец, что позволило создать индивидуальный внутренний стандарт для каждого образца. Оценка размера анализируемых таким способом продуктов амплификации воспроизводится в независимых повторях эксперимента, отличаясь не более чем на один нуклеотид. Таким образом, были установлены точные размеры целевых продуктов всех исследуемых тополей в двукратной повторности.

Различающая способность предложенной системы из 6 микросателлитных локусов была оценена с помощью наблюдаемой гетерозиготности (Ho) и показателя идентичности

(PI) для каждого локуса (табл. 1). Показатель идентичности, PI (Probability of Identity) отражает вероятность случайного совпадения значений всех проанализированных маркеров у разных организмов. В данном случае вероятность случайного совпадения у образцов тополя по 6 микросателлитным маркерам составила $1,24 \times 10^{-8}$. Аллели микросателлитных маркеров, специфичные для клонов тополей невского и ленинградского, представлены в табл.2.

Таблица 1. Характеристика разнообразия микросателлитных локусов в исследованной выборке тополей. H_o – наблюдаемая гетерозиготность. PI – показатель идентичности.

Локус	Число аллелей	Диапазон размеров аллелей	H_o	PI
PTR6	14	182-210	0.797	0.05
PTR7	15	220-260	0.205	0.06
WPMS15	11	184-218	0.835	0.07
WPMS20	13	212-240	0.861	0.08
PMGC14	13	179-218	0.861	0.13
PMGC2060	9	140-178	0.544	0.07
Среднее	12.5	—	—	0.08
Общий PI для всех локусов				1.24×10^{-8}

Таблица 2. Сортоспецифичные комбинации аллелей 6 SSR-локусов для тополя невского и тополя ленинградского

Сорт-клон	PTR6	PTR7	PMGC14	PMGC2060	WPMS15	WPMS20
<i>P.x newensis</i>	184/190	234/234	191/200	140/170	187/197	216/236
<i>P.x leningradensis</i>	194/194	248/248	191/200	144/164	190/212	216/221

На рис. 2 представлена UPGMA-дендрограмма, отражающая генетическое расстояние между 75 исследованными образцами тополей по 6 микросателлитным локусам. Результаты генотипирования гербарных экземпляров тополя ленинградского полностью совпали с результатами, полученными для восьми деревьев, образующих аллею у главного здания СПбГЛТУ (рис.3а). Дерево из дендрария СевНИИЛХ, этикетированное, как “тополь ленинградский 2125”, оказалось генетически близким к обсуждаемой группе, однако отличалось аллелями локуса WPMS20 (226/232 вместо 216/220). Возможной причиной выявленного несоответствия генотипов тополя

ленинградского с экземпляром из СевНИИЛХ могут быть соматические мутации. Ранее отмечалось, что, несмотря на стабильность и достоверность генотипирования микросателлитных локусов, соматические мутации обнаруживаются достаточно часто, особенно в многолетних клоновых посадках.

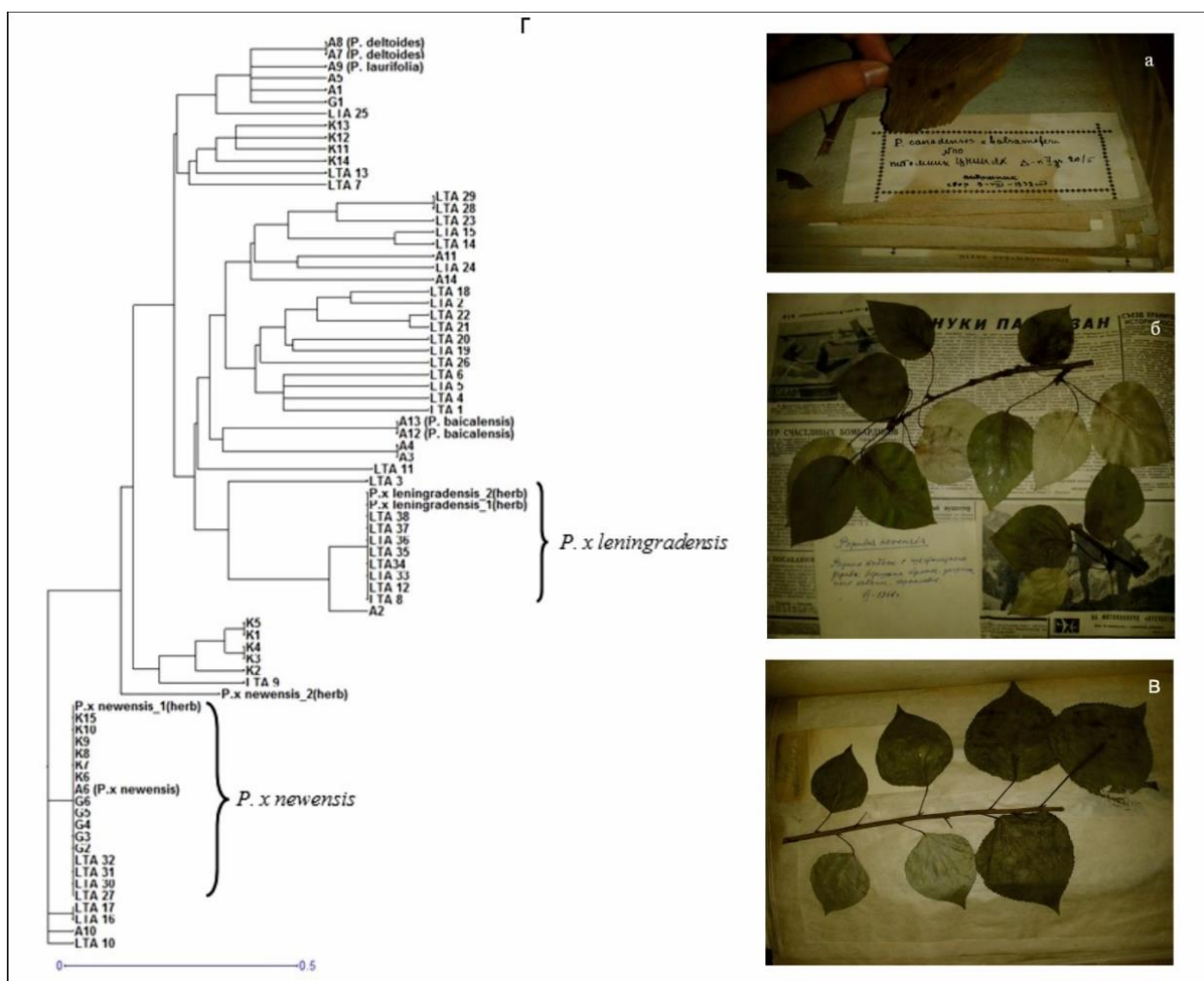


Рис. 2. Генетическое сходство исследованных образцов тополей по 6 микросателлитным локусам с аутентичными гербарными сборами П.Л. Богданова. Слева: UPGMA-дендрограмма, отражающая генетическое сходство исследованных образцов, включая гербарный материал (herb). Справа: (а) гербарные экземпляры тополя невского (*Populus × newensis* Bogd.) 1938 г.; (б) тополя невского (*Populus × newensis* Bogd.) 1966 г.; (в) тополя ленинградского (*Populus × leningradensis* Bogd.) в Гербарии СПбГЛТУ.

ДНК гербарного экземпляра тополя невского (1966 г.) оказалась идентичной ДНК дерева из дендрария СевНИИЛХ с этикеткой “*Populus newensis* Bogd.”, а также тополей из части насаждений Карташевского участкового лесничества Ленинградской области, заложенных в 1972 г. (рис.3б). Кроме этих посадок, полное совпадение с ДНК гербария тополя невского по аллелям всех проанализированных SSR локусов показали 5 из 6 тополей из дендрария Глуховского питомника ГУП “Лесопарковая зона Санкт-Петербурга”, а также 4 дерева в парке СПбГЛТУ. В этот же кластер генетически идентичных деревьев вошел экземпляр тополя невского из дендрария СевНИИЛХ. Примечательно, что довоенный гербарный экземпляр тополя невского (1938 г.),

утраченный в период блокады Ленинграда (*P. × newensis_2(herb)*) (рис. 2), генетически отличается от тополей, которые считаются его вегетативным потомством, включая гербарный экземпляр 1966 года.

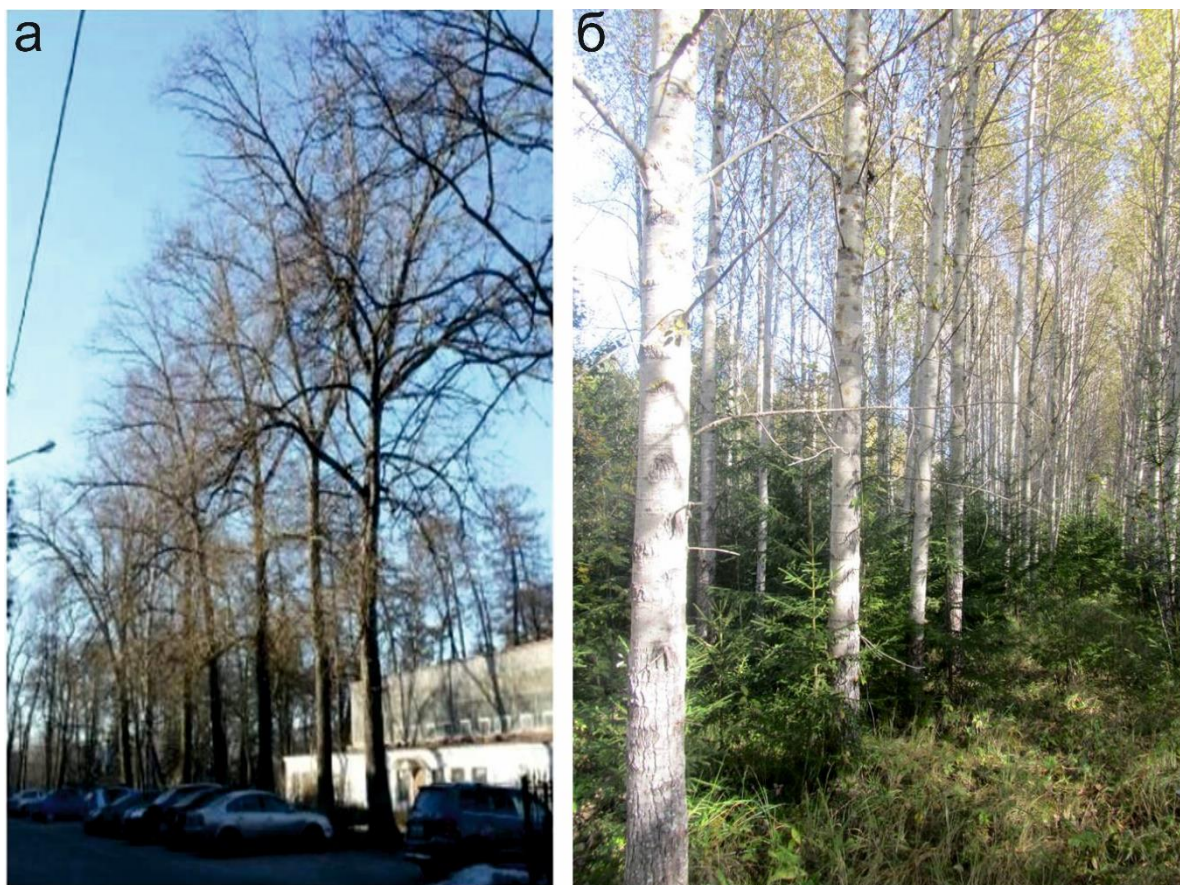


Рис. 3. Идентифицированные по результатам ДНК-фингерпринтинга клоновые посадки тополей. (а) тополя ленинградского в парке СПбГЛТУ. (б) тополя невского в Карташевском участковом лесничестве (Ленинградская обл.).

Идентификация клонового потомства осин селекции А. С. Яблокова и С. Н. Багаева
В СПбНИИЛХ (г. Санкт-Петербург) в 1999-2000 годах была создана коллекция линий *in vitro* некоторых лучших клонов, так называемых, костромских триплоидных осин селекции А. С. Яблокова и С. Н. Багаева, которые характеризовались быстрым ростом и устойчивостью к стволовой гнили. Через некоторое время на опытных участках Сиверского лесхоза в Гатчинском районе (Ленинградская область) были заложены лесные плантации клонов этих осин, размноженных *in vitro*. При реорганизации Сиверского лесхоза схема посадки была утеряна, однако родительские *in vitro* линии клонов костромских осин по-прежнему сохранялись в СПбНИИЛХ. Так как некоторые деревья на опытных участках демонстрировали необычайно высокий рост, были основания полагать, что именно они являются потомками костромских осин.

Триплоидность костромских осин затрудняет использование классического метода ДНК-фингерпринтинга – микросателлитного маркирования. Поэтому для данной работы были использованы ISSR-маркеры, которые позволяют проанализировать сразу множество локусов в одной реакции амплификации. На начальном этапе был осуществлен подбор подходящих ISSR праймеров – достаточно полиморфных, чтобы отличить

родительские линии друг от друга, и в то же время дающих не слишком много ПЦР-продуктов, чтобы избыточность последних не затрудняла анализ. Проверка 8 ISSR-праймеров осуществлялась на 8 образцах, относящихся к 3 исходным родительским линиям осин (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика протестированных ISSR-маркеров (Y= C или T; R= A или G).

Локус	Последовательность 5'-3'	Число фрагментов	Число полиморфных фрагментов
HB12	(CAC) ₃ GC	15	10 (67%)
M2	(AC) ₈ YG	24	18 (75%)
M10	(CA) ₆ RG	18	4 (22%)
M12C	(CA) ₆ RC	20	15 (75%)
M11G	(CA) ₆ G	22	9 (40%)
M13T	(AGC) ₄ T	20	11 (55%)
M13C	(AGC) ₄ C	16	10 (62%)
M14	(GACA) ₄	13	4 (31%)

ISSR-маркер M12C оказался достаточно полиморфным, чтобы разделить все три родительских линии. Поэтому он был использован для генотипирования 64 деревьев с исследуемого опытного участка. Анализ профилей ДНК, полученных с этим маркером, позволил выделить три группы рамет (рис. 4а). Для каждой из трёх групп был построен график роста на основе данных, собранных за 14 лет наблюдения (рис. 4б). При сборе этих данных также учитывался рост естественной осиновой поросли такого же возраста неподалёку от участка.

Как следует из рис. 3, группы 1 и 2 схожи между собой по характеристикам роста, и после 10 летнего возраста значительно превосходят контроль. Некоторые деревья достигают высоты 15-16 метров и диаметра 16-17 см уже в возрасте 13 лет, что является очень хорошими показателями для осин в условиях Ленинградской области.

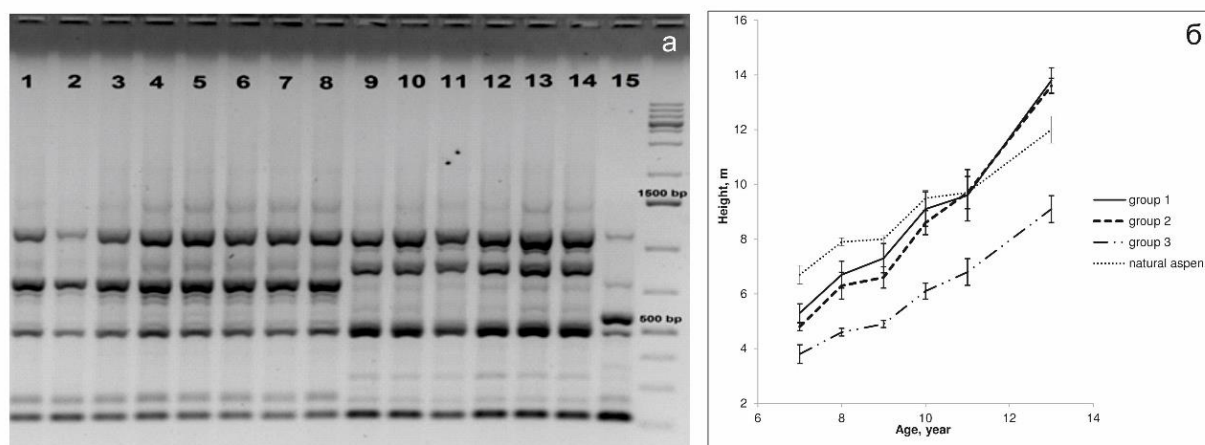


Рис. 4. (а) Три типа ДНК-профилей, выявленных с помощью ISSR-маркера M12C среди 64 деревьев на участке №6 бывшего Сиверского лесхоза. (б) Динамика роста трех групп

клонов осин на участке №6 по данным за 14 лет наблюдений; natural aspen – показатели роста естественной поросли осин, растущего рядом с участком.

Создание картирующей популяции гибридных осин в Ленинградской области

В апреле 2016 года было проведено искусственное скрещивание двух родительских генотипов осин «на срезанных ветках» (рис. 5). Родительские деревья, произрастающие на территории Санкт-Петербурга, были примерно одного возраста – 28-32 года и имели схожие таксационные показатели: 17,6 м в высоту и 0,23 м в диаметре на уровне груди – мужское дерево и 19,8 м и 0,27 м - женское. При этом мужское дерево серьёзно повреждалось морозами, отставая по срокам распускания генеративных и вегетативных почек от женского дерева на 10 и 6 дней соответственно.

Завязавшиеся после искусственного опыления и созревшие семена были собраны и пророщены во влажном грунте. Через две недели проростки были пересажены в отдельные горшки и подращивались в теплице до сентября 2016 года (рис. 5). Перед посадкой у всех саженцев была измерена высота и собраны образцы для выделения ДНК. Саженцы были разбиты на три группы и высажены в трех разных регионах:

- 1) 122 растения были высажены на юго-западе Ленинградской области – регион с атлантико-континентальным климатом. Влияние Балтийского моря приводит к тёплому и влажному, но короткому лету и умеренно холодной влажной зиме с частыми оттепелями.
- 2) 110 саженца были переправлены для закладки плантации в Западную Сибирь, Сургут (Тюменская область). Климат – континентальный субарктический с длинной и очень холодной зимой и коротким, относительно тёплым летом.
- 3) 90 саженцев сформировали плантацию в Воронежской области с умеренно-континентальным климатом с длинной холодной зимой и тёплым летом.

Популяция гибридов осин F1, высаженная в Ленинградской области, была генотипирована с использованием технологии GBS (Genotyping By Sequencing), а именно, методом ddRADseq (double-digest restriction site-associated DNA sequencing). Помимо этого, были генотипированы родительские деревья, в 8 повторностях каждое. По результатам секвенирования было получено 33,8 Гб данных, содержащих 236,56 миллионов ридов (одноконцевых прочтений). Полученные риды были картированы на референсный геном *P. trichocarpa*: 82,62% и 81,89% ридов материнского и отцовского образцов соответственно нашли гомологичный участок в референсном геноме, и, в среднем, 77,51% ридов было картировано на референсный геном для их 122 потомков. С помощью алгоритмов пайплайна GATK было идентифицировано 16234 SNP, полиморфных либо между родительскими генотипами, либо между референсной последовательностью и родительскими генотипами.

SNP, полиморфные между родителями, были использованы для валидации гибридного происхождения 122 потомков с помощью программы Admixture. Как и ожидалось, число предковых генотипов соответствовало двум родителям. 115 осин поколения F1 чётко демонстрировали своё гибридное происхождение. 7 гибридов оказались неявного происхождения, поэтому были исключены из дальнейшего анализа.



Рис. 5. Этапы получения популяции. (а) Скрещивание «на срезанных ветках», опыление женских серёжек предварительно собранной пыльцой. (б) Проращивание семян в земле. (в) Пересаживание проростков в кассеты и перенос растений в теплицу. (г) Пересаживание саженцев в индивидуальные горшки большего размера. (д) Саженцы перед посадкой в открытый грунт в сентябре 2016 года.

Для каждого SNP был проведён тест χ^2 для проверки их наследования в соответствии с Менделевскими расщеплениями 1:1, 1:2:1 и 1:1:1:1 среди потомков F1. В дальнейшем анализе использовались только те SNP, которые достоверно соответствовали Менделевскому расщеплению.

Для построения женской генетической карты из отфильтрованных SNP были выбраны те, которые были гетерозиготны (ab) у материнского организма и гомозиготны у отцовского (aa), а в популяции F1 расщеплялись в соотношении 1:1. Кроме того, данные

полиморфизмы должны были выявляться во всех 8 повторностях материнского и отцовского генотипов, а также присутствовать у более, чем 90% особей из популяции F1.

При отборе SNP для отцовской карты действовали те же критерии, однако в этом случае отбирались гетерозиготные (ab) локусы у отцовского организма и гомозиготные (aa) у материнского. Всего было отобрано 1000 SNP для построения женской генетической карты и 1055 для мужской. Далее, SNP собирались в группы сцепления (LG) отдельно для каждой хромосомы с помощью программы JoinMap 3.0. Длина групп сцепления варьировала от 106,01 сМ (LG9) до 300,24 сМ (LG1) для женской генетической карты (среднее расстояние между локусами – 3,05 сМ) и от 107,3 сМ (LG9) до 361,07 сМ (LG1) для мужской генетической карты (среднее расстояние между локусами – 2,93 сМ). Полученные мужская и женская генетические карты достаточно хорошо согласуются между собой с коэффициентом корреляции 0,91 по длине 19 групп сцепления.

Картирование генетических локусов, ассоциированных со скоростью роста осины на ранних этапах развития

Сконструированные генетические карты использовались для картирования QTL для признаков, связанных с темпами развития осины. В конце первого вегетационного сезона высота растений, высаженных в Ленинградской области, варьировала от 15 до 127 см. При картировании QTL с использованием мужской генетической карты для этого признака порог значимости, рассчитанный тестом 1000 пермутаций, был $LOD = 3,6$ ($p < 0,05$). Наиболее значимый QTL ($LOD=5,73$), объясняющий 18% фенотипической изменчивости, был выявлен на группе сцепления LG5 (рис. 6а). Были идентифицированы сцепленные с локусом SNP: NC_008471.2_15136737 (96,94 сМ); NC_008471.2_13107624 (104,153 сМ); NC_008471.2_12784748 (108, 322 сМ). В случае картирования QTL с использованием женской генетической карты для признака «высота растения в конце первого вегетационного сезона» порог значимости составил $LOD = 3,5$ ($p < 0,05$). Наиболее значимый QTL ($LOD=3,9$), объясняющий 15% изменчивости признака был обнаружен на LG16 (рис. 6б). Сцепленные с этим QTL SNP-маркеры были следующими: NC_008482.2_6139958 (70,845 сМ) и NC_008482.2_6542789 (72,234 сМ).

Зима 2016-2017 года в Ленинградской области характеризовалась резкими перепадами температуры, оттепелями и внезапными заморозками, скудным снежным покровом. Все эти факторы привели к вымерзанию и повреждению многих саженцев. Тем не менее, в конце второго вегетационного сезона повторно измерялась высота осин F1. Кроме того, измерялся диаметр прикорневой шейки. Из-за вымерзания выборка генотипированных осин уменьшилась до 74, это меньше, чем рекомендуется для корректного QTL-анализа. Тем не менее, при картировании QTL для высоты с использованием мужской генетической карты, наиболее значимым и достоверным оказался пик ($LOD=5,03$) на LG5, сцепленный с теми же самыми SNP, что и для результатов прошлого года (рис. 7а). При картировании QTL для диаметра прикорневой шейки с использованием мужской генетической карты порог значимости был $LOD = 3,3$ ($p < 0,05$). Его превысил значимый и достоверный пик ($LOD=5,21$) на хромосоме LG5 (рис. 7б), поддерживаемый теми же SNP, что и QTL связанный с высотой.

При картировании QTL с использованием женской генетической карты для высоты и диаметра прикорневой шейки в конце второго вегетационного сезона пик на LG16 не воспроизвелся.

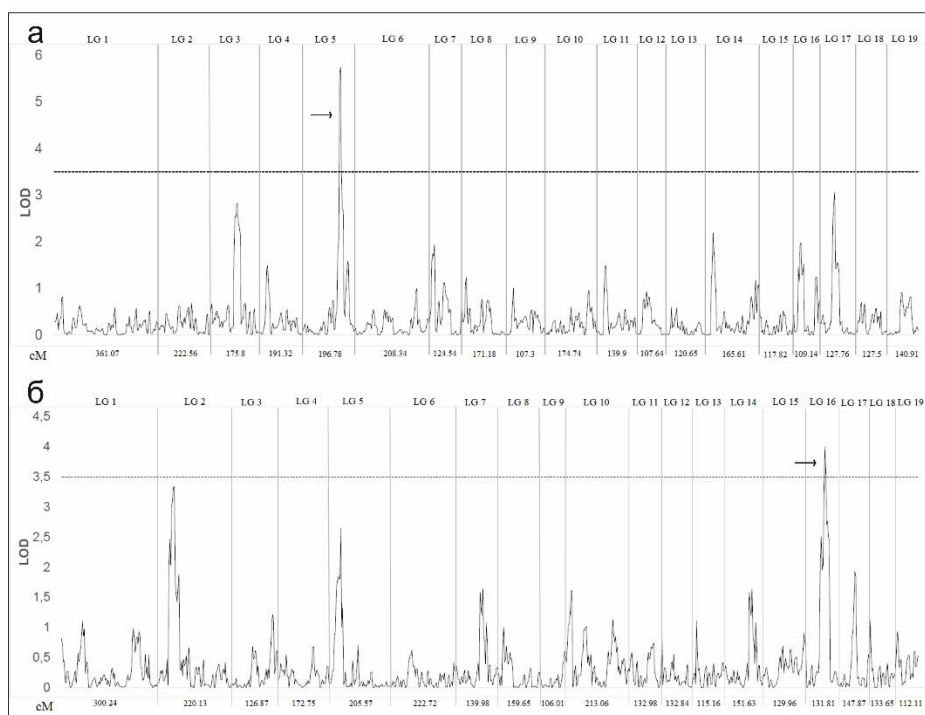


Рис. 6. Картирование QTL, связанных с изменчивостью высоты саженцев в конце первого вегетационного сезона (2016 г). LG – linkage group, группа сцепления. Внизу указана длина LG, сМ. (а) С использованием мужской генетической карты. (б) С использованием женской генетической карты. Стрелками указаны локусы, для которых вероятность сцепления с изменчивостью изучаемого признака превышает пороговое значение.

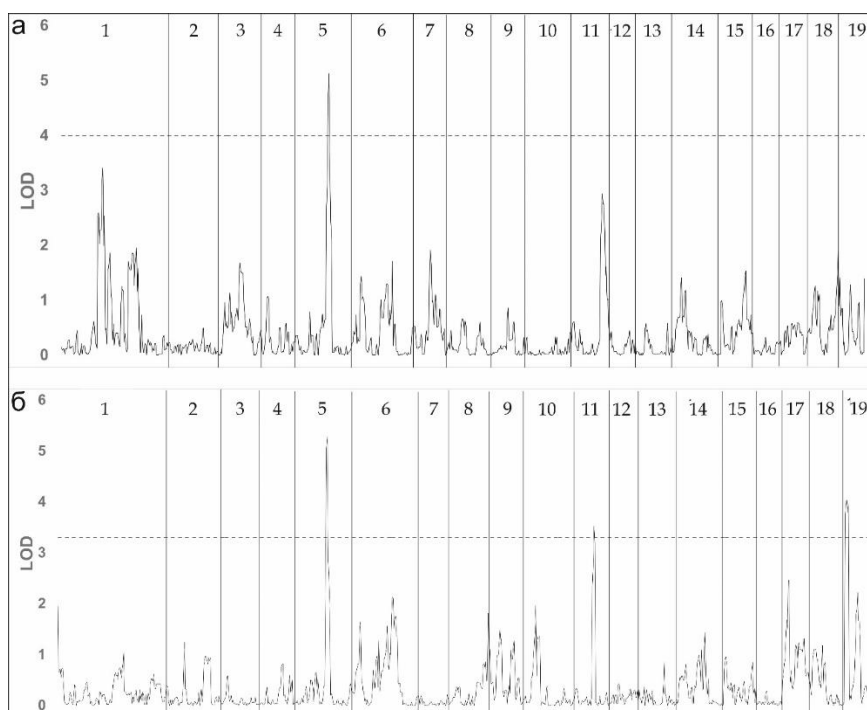


Рис. 7. QTL, картированные с использованием мужской генетической карты. а) для высоты саженцев в конце второго вегетационного сезона (2017 г). б) для диаметра прикорневой шейки в конце второго вегетационного сезона.

Генотипирование популяций осин F1 в Сургуте и Воронежской области

В 2017 году в процессе картирования QTL для признака высоты растения после первого вегетационного сезона было выявлено 2 значимых локуса: на LG5 и LG16, которые влияли на высоту гибридного саженца, в зависимости от того, какая аллель была им унаследована, материнская или отцовская. Для каждого из картированных QTL были идентифицированы сцепленные SNP, которые потенциально могли стать молекулярными маркерами для генотипирования осин F1, высаженных в Сургуте и Воронежской области, с целью выявления среди них гибридов с потенциально ускоренным ростом. Популяции в этих регионах не были генотипированы секвенированием, как популяция в Ленинградской области. Однако для выяснения влияния уже выявленных QTL на рост популяций гибридных осин в других климатических условиях достаточно установить, какой вариант, отцовский или материнский, был унаследован конкретным гибридом. Для этого для SNP, сцепленных с QTL, были разработаны молекулярные маркеры, основанные на ПЦП-РВ с использованием TaqMan проб, конкурентно отжигающихся на исследуемую последовательность, достаточно специфичные, чтобы различить однонуклеотидную замену. В случае гомозиготы отжигается только один из двух зондов. В случае гетерозиготы отжигаются оба зонда и детектируется свечение сразу двух флуорофоров.

В каждом локусе SNP располагаются недалеко друг от друга и, скорее всего, наследуются сцеплено, поэтому достаточно идентифицировать хотя бы один SNP в каждом локусе. Таким образом, были подобраны праймеры и зонды для исследования SNP NC_008471.2_12784748 на LG5 и SNP NC_008482.2_6139958 на LG16 (рис. 8).

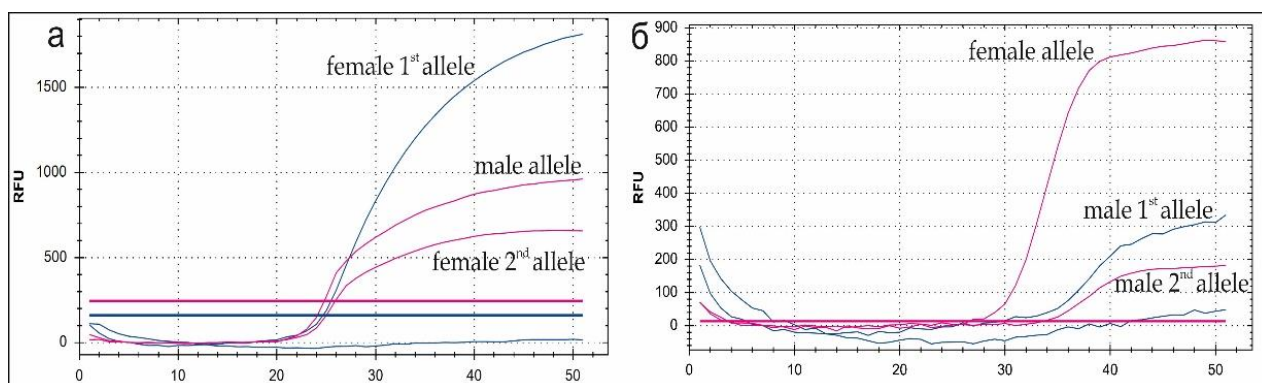


Рис. 8. Идентификация отцовского и материнского вариантов у осин F1 Сургута и Воронежской области с помощью ПЦП-РВ. (а) для локуса NC_008482.2_6139958 (LG16).

Гетерозигота – материнский вариант, гомозигота – отцовский. (б) для локуса NC_008471.2_12784748 (LG5). Гетерозигота – отцовский вариант, гомозигота – материнский.

В конце второго вегетационного сезона у осин F1 популяций Сургута и Воронежской области была измерена высота. После генотипирования каждая популяция для каждого локуса была разбита на две группы – с отцовским или материнским аллелем соответствующего SNP.

По результатам t-теста не было выявлено статистически значимых различий групп по локусу NC_008482.2_6139958 (LG16) в обеих популяциях (рис. 9). Деревья, унаследовавшие отцовский вариант, достоверно не отличались по высоте от деревьев, унаследовавших материнский вариант. Однако деревья, унаследовавшие отцовский

вариант локуса NC_008471.2_12784748 (LG5) оказались статистически значимо более высокими, чем деревья, унаследовавшие материнский вариант, вне зависимости от места произрастания (рис. 10). Таким образом, было установлено, что локус, выявленный на группе сцепления LG5 в позиции 108 сМ, достоверно влияет на изменчивость по высоте однолетних и двулетних гибридных растений осины, вне зависимости от региона выращивания.

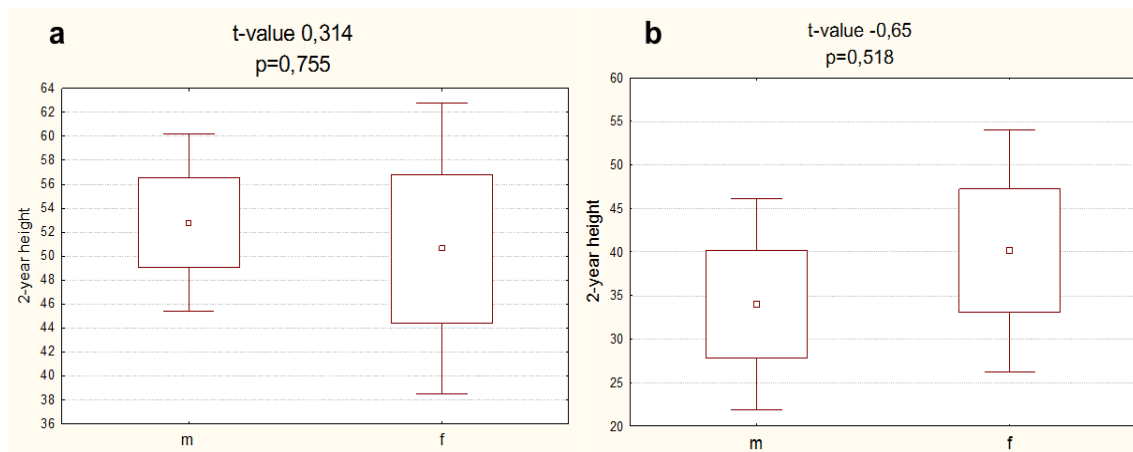


Рис. 9. Недостоверные различия (t-test) по высоте гибридов осины, унаследовавших альтернативные родительские аллели в локусе NC_008482.2_6139958 (LG16). m (male) – группа с отцовским генотипом; f (female) – группа с материнским генотипом. (а) популяция в Воронежской области. (б) популяция в Сургуте.

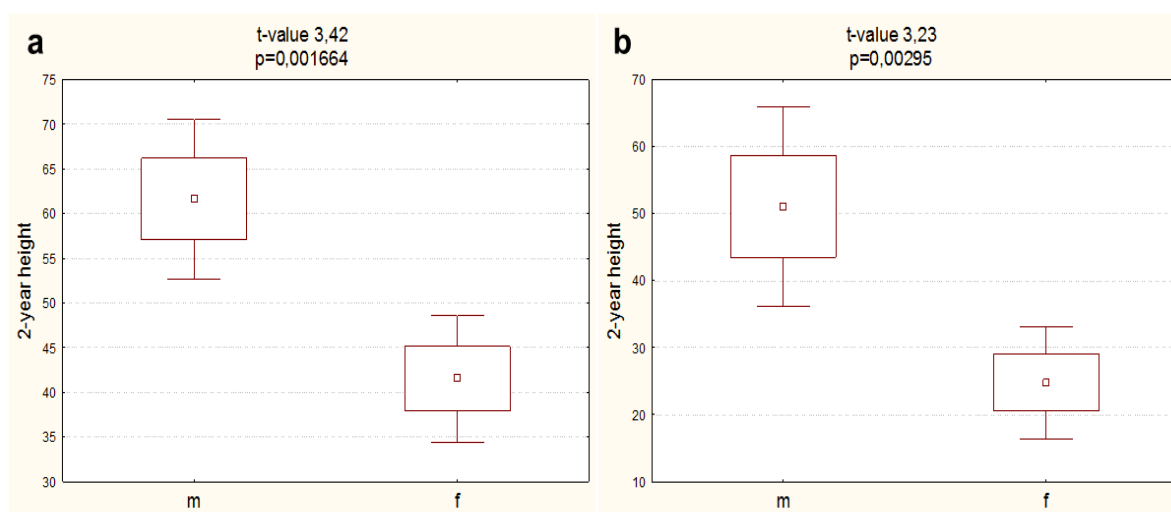


Рис. 10. Достоверные различия (t-test) по высоте гибридов осины, унаследовавших альтернативные родительские аллели в локусе NC_008471.2_12784748 (LG5). m (male) – группа с отцовским генотипом; f (female) – группа с материнским генотипом. (а) популяция в Воронежской области. (б) популяция в Сургуте.

Выводы

1. По результатам микросателлитного анализа идентифицированы ценные гибридные клоны тополя невского и тополя ленинградского селекции Л. П. Богданова, информация о посадках которых была утеряна. Эти гибриды являются первыми в России

селекционными достижениями для древесных пород, полученными классическими методами селекции – скрещиванием с последующим отбором. Учитывая, что процесс получения этих сортов-клонов тополя потребовал от их создателей нескольких десятилетий напряженной работы, вопрос о сохранении и использовании этих достижений отечественной селекции является актуальным.

2. Методами ДНК-фингерпринтинга проведена генетическая инвентаризация клоновых плантаций быстрорастущей осины СПБНИИЛХ, исходный материал которых был получен от клонового потомства триплоидных осин А. С. Яблокова. По результатам проведенных работ удалось восстановить посадочную ведомость плантации клонов триплоидной осины, а также установить происхождение высаженных клонов от конкретных родительских генотипов, сохраняемых в коллекции *in vitro* СПБНИИЛХ.

3. Создана популяция гибридов F1 осины, полученная в результате контролируемого скрещивания от двух родителей с контрастными фенотипами. Полученная популяция сибсов была генотипирована с использованием технологии RADseq, что позволило получить информацию о полиморфизме 2055 локусов (SNP) и впервые сконструировать генетическую карту высокой плотности для осины обыкновенной. Созданная картирующая популяция представляет собой исследовательский ресурс для поиска генетических локусов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки осины.

4. По результатам QTL-анализа с использованием полученной генетической карты осины на группе сцепления LG5 в позиции 108 сМ идентифицирован генетический локус, сцепленный с изменчивостью показателя роста у одно- и двулетних растений осины, вне зависимости от климатических условий.

5. Для выявленного QTL разработан молекулярный маркер на основе ПЦР-РВ, который может быть использован для маркер-вспомогательной селекции клонов осин с ускоренными темпами роста осины на начальных этапах развития.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Лебедева М. В., Левкоев Э.А., Волков В. А., Фетисова А. А., Навалихин С. В., Шабунин Д.А., Данилов Ю. И., Жигунов А. В., Потоккина Е.К. (2016). Восстановление утерянных селекционных достижений *Populus x leningradensis* Bogd. и *Populus x newensis* Bogd. на основе микросателлитного анализа // Генетика т. 52 №10, 1159-1168с DOI 10.1134/S1022795416100069

2) Zhigunov A.V., Ulianich P.S., Lebedeva M.V., Chang P.L., Nuzhdin S.V., Potokina E.K. (2017). Development of F1 hybrid population and high-density linkage map for European aspen (*Populus tremula* L.) using RAD-seq technology // BMC Plant Biology 17(Suppl1):180, P. 87-98 DOI 10.1186/s12870-017-1127-y

3) Zhigunov A.V., Shabunin D.A., Butenko O. Yu, Lebedeva M.V. (2018). Fast and cheap identification of elite aspen clones in the North-West of Russia using ISSR markers // Folia Forestalia Polonica Series A, vol. 60(4), P. 207-213 DOI: 10.2478/ffp-2018-0021

ПРОЧИЕ ПУБЛИКАЦИИ

1) Teplyakova S.B., Lebedeva M.V., Ivanova N., Horeva V., Voytutskaya N., Kovaleva O., Potokina E. (2017). Impact of the 7-bp deletion in HvGA20ox2 gene on agronomic

- important traits in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *BMC Plant Biology* 17(Suppl 1):181, P. 99-108 DOI 10.1186/s12870-017-1121-4
- 2) Dontsova A. A., Alabushev A. V., Lebedeva M. V., Potokina E. K. (2018) analysis of polymorphism of microsatellite markers linked to a long-term net form of net blotch resistance gene in winter barley varieties in the south of Russia // *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, V. 78. №3. P.317-323 DOI: 10.31742/IJGPB.78.3.4
 - 3) Злобин Н.Е., Лебедева М.В., Таранов В.В., Харченко П.Н., Бабаков А.В. (2018). Редактирование генома растений путем направленной замены азотистых оснований // *Биотехнология*. Т. 34. №6. 59-68 с. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-59-68
 - 4) Zlobin N., Lebedeva M., Taranov V. (2020). CRISPR/Cas9 genome editing through in planta transformation // *Critical Reviews in Biotechnology*. V. 40. №6. P. 153-168. DOI: 10.1080/07388551.2019.1709795
 - 5) Zlobin N., Lebedeva M., Monakhova Y., Ustinova V., Taranov V. (2021). An ERF121 transcription factor from *Brassica oleracea* is a target for the conserved TAL-effectors from different *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains // *Molecular Plant Pathology* V. 22. №5. P. 618-624. DOI: 10.1111/mpp.13048
 - 6) Лебедева М.В., Никонова Е. Ю., Терентьев А.А., Таранов В.В., Бабаков А. В., Никонов О.С. (2021). VPg вируса PVY и кэп-связывающие факторы семейства eIF4E картофеля: избирательность взаимодействия и его предполагаемый механизм // *Биохимия* V.86. №9. 1352-1365 с.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Е.К. Потокиной, а также А.В. Жигунову, под чутким руководством которого было произведено скрещивание и получена картирующая популяция осин. Автор благодарит С.В. Нуждина и коллектив его лаборатории в Южно-Калифорнийском университете за возможность использования высокопроизводительных методов для генотипирования популяции. Отдельно автор благодарит сотрудников лаборатории стрессоустойчивости растений ВНИИСБ: Таранова В.В. и Бабакова А.В. за дружескую поддержку при подготовке текста диссертации и её защите.