

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров

О.В. Дорогина^{1,3}✉, Н.С. Нуждина¹, Г.А. Зуева¹, Ю.А. Гисматулина², О.Ю. Васильева¹

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ olga-dorogina@yandex.ru

Аннотация. Уникальным примером травянистых растений, характеризующихся высокими значениями нарастания надземной вегетативной массы и практическим применением в качестве источника альтернативной энергии, является родовой комплекс *Miscanthus* Anderss. (Poaceae). Мискантус относится к числу наиболее эффективных аккумуляторов солнечной энергии, и поскольку фитомелиоративное использование подразумевает выращивание этих ресурсных видов на неудобьях и полутенистых участках, то встает вопрос о влиянии недостаточного освещения на показатели продуктивности мискантуса. В результате длительной интродукции в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН создана перспективная для условий лесостепи Западной Сибири популяция *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Benth. Целью данного исследования было изучение особенностей побегообразования, оценка целлюлозы и лигнина в популяциях *M. sacchariflorus* при различных условиях освещенности и паспортизация перспективной популяции с помощью ISSR-маркеров. Оценка побегообразования и количества накапливаемой целлюлозы и лигнина у растений проводилась в зависимости от освещенности (один вариант выращивался на солнечном участке, а другой – в полутени). В результате дисперсионного анализа установлено, что число побегов зависит не от экологических условий, а от возраста растения, в то время как на высоту растений существенно воздействуют экологические условия. Несмотря на то что для образцов обоих вариантов *M. sacchariflorus* была характерна различная скорость создания сплошного проективного покрытия, растения на полутенистых участках образовывали до 89.34 % побегов в сравнении с растениями на освещенных участках, что не оказывало существенного влияния на величину надземной массы и содержание в ней целлюлозы. В результате электрофореза геномной ДНК в популяции *M. sacchariflorus* при амплификации с пятью ISSR-праймерами выявлены уникальные молекулярные полиморфные фрагменты, которые были применены для идентификации и паспортизации данной популяции. Таким образом, комплексное использование *M. sacchariflorus* в качестве средолучшающей и биоэнергетической культуры обусловлено высоким адаптивным потенциалом вида. Обнаружено, что фактор освещенности практически не влияет на количество целлюлозы в стебле, а пониженное содержание технологически нежелательного компонента, лигнина, отмечено при выращивании в условиях полутени. Ключевые слова: род *Miscanthus*; биоэнергетика; целлюлоза; лигнин; побегообразование; паспортизация; ISSR-маркеры.

Для цитирования: Дорогина О.В., Нуждина Н.С., Зуева Г.А., Гисматулина Ю.А., Васильева О.Ю. Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):22-29. DOI 10.18699/VJGB-22-04

Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers

O.V. Dorogina^{1,3}✉, N.S. Nuzhdina¹, G.A. Zueva¹, Yu.A. Gismatulina², O.Yu. Vasilyeva¹

¹ Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ olga-dorogina@yandex.ru

Abstract. The generic complex *Miscanthus* Anderss. (Poaceae) is a unique example among herbaceous plants characterized by high values of growth of aboveground vegetative mass and practical use as a valuable source of alternative energy. *Miscanthus* is one of the most efficient solar energy accumulators, and since phytomeliorative use implies the cultivation of these resource plants in inconvenient and semi-shady areas, the question about the effect of insufficient

lighting on the productivity of *Miscanthus* arises. As a result of a long-lasting introduction effort, the Central Siberian Botanical Garden SB RAS created a population of *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Benth., which has good prospects for growing under the conditions of the forest-steppe area in Western Siberia. The goals of our study were: (1) to determine the peculiarities of shoot formation, (2) to assess the cellulose and lignin accumulation in *M. sacchariflorus* populations under different lighting conditions and (3) to perform a DNA passportization of the *Miscanthus* population by ISSR marking. Evaluation of shoot formation and the amount of accumulated cellulose and lignin in plants was carried out under different degrees of illumination: one variant was grown in a sunny area, and the other, in partial shade. As a result of analysis of variance, it was found that the number of shoots does not depend on environmental conditions, but on the age of the plant, while environmental conditions have a significant effect on plant height. Although the samples of both *M. sacchariflorus* variants were characterized by different rates of creation of a continuous projective cover, plants in semi-shaded areas formed up to 89.34 % of shoots compared to their peers in illuminated areas, which did not affect significantly the size of the aboveground mass and the cellulose content in it. As a result of ISSR-analysis of genomic DNA in the *M. sacchariflorus* population, unique molecular polymorphic fragments were identified, which can be used for identification and DNA passportization at the inter-population level. Thus, the complex use of *M. sacchariflorus* as a valuable meliorative and bioenergetic culture is due to the high adaptive potential of this species. It was found that the illumination factor has virtually no effect on the amount of the cellulose content in the shoot, and a reduced content of the technologically undesirable lignin was observed in plants growing in the partial shade conditions. Key words: *Miscanthus*; bioenergy; cellulose; lignin; shoot formation; DNA passportization; ISSR markers.

For citation: Dorogina O.V., Nuzhdina N.S., Zueva G.A., Gismatulina Yu.A., Vasilyeva O.Yu. Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):22-29. DOI 10.18699/VJGB-22-04

Введение

За последние два десятилетия виды рода *Miscanthus* вошли в число растительных объектов, считающихся практически неисчерпаемыми источниками возобновляемого сырья для получения глюкозы, которая является базовым продуктом для многих разработок в области альтернативной энергетики (Слынько и др., 2013). Мискантус относится к числу наиболее эффективных аккумуляторов солнечной энергии на планете (Dohleman, Long, 2009). Согласно исследованиям физиологов, виды *Miscanthus* обладают высокой потенциальной продуктивностью. Получение до 40 тонн сухой биомассы с гектара связывают с характерным для всех представителей данного рода C₄-типом фотосинтеза. В отличие от большинства традиционно культивируемых C₄-растений, таких как сахарный тростник и кукуруза, мискантусы способны поддерживать высокую интенсивность фотосинтеза даже в условиях сравнительно пониженных температур (Naidu et al., 2003; Анисимов и др., 2016). Этим объясняется высокая продуктивность веерников, выращиваемых в более суровых, чем естественные, климатических условиях лесостепи Западной Сибири в качестве технической (биоэнергетической) культуры. Фитомелиоративное использование подразумевает выращивание ресурсных видов на неудобьях и полутенистых участках. В частности, это относится и к растениям *M. sacchariflorus*, для осуществления фотосинтеза которых требуется значительный приток фотосинтетически активной радиации. Литературных сведений по этому вопросу, относящихся к *M. sacchariflorus*, практически нет.

В настоящее время проблема генетической идентификации дикорастущих видов и популяций растений чрезвычайно актуальна и находится на начальном этапе развития, а для регистрации и сертификации новых сортов важным этапом считается генетическая паспортизация (Калаев и др., 2012). Основой системы маркирования отборных форм или сортов с целью генетической паспортизации является получение генетически детерминированных ха-

рактеристик с помощью молекулярных маркеров. В качестве таких маркеров могут использоваться белки, в частности запасные белки, изоферменты или локусы ДНК (ДНК-маркеры) (Naeem, 2014; Челюстникова и др., 2019). С помощью ISSR- и IRAP-маркеров проведена паспортизация сортов и гибридов многих сельскохозяйственных культур (Сухарева, Кулуев, 2018), а также молекулярно-генетическая паспортизация редких и нуждающихся в охране травянистых видов растений, разработанная на примере природных популяций двух видов – *Adonis vernalis* и *A. sibirica* (Боронникова, 2009). На основе этой методики получен патент на изобретение «Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений» (Бобошина, Боронникова, 2014). Для аутентификации сырья лекарственных растений по корням или другим фрагментам материала используются ДНК-маркеры и химические характеристики, так как они нетканеспецифичны и обладают высокой разрешающей способностью (Wallinger et al., 2012; Ganica et al., 2015). Литературных данных по паспортизации перспективных популяций или сортов мискантуса нами не обнаружено.

Цель нашего исследования – изучение особенностей побегообразования, оценка целлюлозы и лигнина в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* при различных условиях освещенности и паспортизация популяции с помощью ISSR-маркеров.

Материалы и методы

Экспериментальные участки Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (ЦСБС СО РАН) расположены в лесостепи Западной Сибири, в Новосибирской области, которая относится к IV световой зоне и по общему числу часов солнечного сияния приближается к Краснодару и Ялте. Объектом исследования явилась отборная популяция *M. sacchariflorus*, выявленная по итогам многолетних интродукционных экспериментов, которая была сформирована из материала, собранного в Хасанском районе Приморского края. Одна выборка из этой попу-

Таблица 1. Характеристики ISSR-праймеров, испытанных и выбранных (выделены жирным) для исследования генетического полиморфизма популяции *M. sacchariflorus*

| № п/п | Нуклеотидная последовательность 5'-3' | Температура отжига, °С |
|-------|---------------------------------------|------------------------|
| 1 | (CA)₆GT | 42 |
| 2 | (CA)₆GG | 42 |
| 3 | (CA)₆AG | 47 |
| 4 | (CT)₈GC | 48 |
| 5 | (CT)₈TG | 51 |
| 6 | (AC) ₈ YG | 55 |
| 7 | (CT) ₈ AC | 48 |
| 8 | (AC) ₈ CG | 47 |
| 9 | (AG) ₁₀ G | 64 |
| 10 | (CA) ₆ RG | 49 |
| 11 | (CTC) ₃ GC | 42 |
| 12 | (CA) ₆ AC | 42 |
| 13 | (CAC) ₃ GC | 41 |
| 14 | (GACA) ₄ | 45 |
| 15 | (GT) ₆ GG | 48 |
| 16 | (GAA) ₆ | 48 |

ляции выращивалась в полутени (образец 1), а другая выборка (образец 2) – на открытом, хорошо освещенном месте. Контролем (образец 3) служила интродукционная популяция *M. sacchariflorus*, из которой были сделаны отборы для изучения особенностей побегообразования.

Экспериментальные растения были высажены в 2017 г. на делянки размером 2×2 м в четырехкратной повторности. Образец 1 размещен в полутени (фактор A₀), а образец 2 – на открытом, хорошо освещенном месте (фактор A₁). На делянках в каждую из расположенных в шахматном порядке 16 лунок (4 лун./м²) было высажено по одному ризому (отрезку корневища) с 5 побегами. Таким образом, общее число побегов при посадке составило 20 шт./м². Образец 3 (контроль) представлял сплошную многолетнюю куртину, расположенную на освещенном месте. Осенью, по окончании вегетации провели обрезку растений, оставляя высоту побегов 15 см от уровня почвы.

В дальнейшем по окончании вегетационных периодов проводили учет числа образовавшихся побегов у растений, сформировавшихся из ризомов. В 2018 г. – у растений второго года (фактор B₀), в 2019 г. – у растений третьего года (фактор B₁). Результаты двухфакторного опыта были обработаны методом дисперсионного анализа по Б.А. Доспехову (1985).

Динамику роста и развития побегов *M. sacchariflorus* изучали методом фенологических наблюдений, путем проведения биометрических измерений и подсчетов количества побегов, сформированных за время вегетационного периода, в течение трех лет.

Химический состав изучали в 2019 г. в надземной части мискантуса, срезанной с отступом 10–15 см от земли. Перед выполнением химического анализа сырье было высушено на воздухе до влажности не более 8 % и измельчено до размера 5–10 мм. Измерения проводили стандартными аналитическими методами на оборудовании Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск). Определение массовой доли целлюлозы выполнено с помощью метода Кюршнера (в пересчете на абсолютно сухое сырье – а.с.с.), с учетом массовой доли кислотонерастворимого лигнина (а.с.с.), пентозанов (а.с.с.), зольности (а.с.с.), экстрактивных веществ – жировосковой фракции (ЖВФ) (экстрагент – дихлорметан, а.с.с.), по стандартным методикам анализа растительного сырья (Оболенская и др., 1991).

Экстракцию геномной ДНК из высушенных листьев осуществляли СТАВ-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Концентрацию ДНК находили спектрофотометрически с помощью BioSpectrometer kinetic и микрокюветы µCuvette G1.0 (Eppendorf, Германия).

Для молекулярного анализа популяций испытано 16 ISSR-праймеров, из них пять наиболее полиморфных были выбраны для получения молекулярно-генетических формул (табл. 1).

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: 1) денатурация ДНК: 90 с при 94 °С; 2) 35 циклов амплификации: 40 с при 94 °С, 45 с при 41–56 °С (отжиг праймера) и 90 с при 72 °С; 3) элонгация цепи: 5 мин при 72 °С. ПЦР-смесь объемом 25 мкл состояла из 2.7 mM MgCl₂, 1.25 mM праймера, 0.4 mM dNTPs, 2.5 мкл 10× PCR-буфера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы и 20 нг геномной ДНК. ПЦР выполняли на амплификаторе Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, США). Продукты реакции разделяли в 1 % агарозном геле. Амплифицированные фрагменты окрашивались SYBR-Green (ThermoFischer Scientific). Визуализацию и видеофиксацию полученных ПЦР-фрагментов осуществляли с помощью системы геледокументирования Gel-Doc XR+ и программного обеспечения ImageLab Software Imaging System (Bio-Rad).

Молекулярно-генетические формулы для паспортизации популяции *M. sacchariflorus* были составлены по принципу, предложенному А.А. Новиковой с соавторами (Новикова и др., 2012).

Статистический анализ проводился в программе MS Excel.

Результаты

В условиях эксперимента у растений *M. sacchariflorus* в третьей декаде мая – первой декаде июня 2018 г. отмечалось отрастание и дальнейшее развитие, но активного наращивания вегетативной массы не наблюдалось, так как температура воздуха в третьей декаде мая не превышала 9.6 °С (рис. 1). Начиная со второй декады июня, с повышением температуры, растения наращивали число побегов за счет активного кущения, и происходил их интенсивный рост.

Благоприятным для веерников с метеорологической точки зрения оказался 2019 г. Среднемесячная температура мая составила 10.8 °С, что способствовало активно-

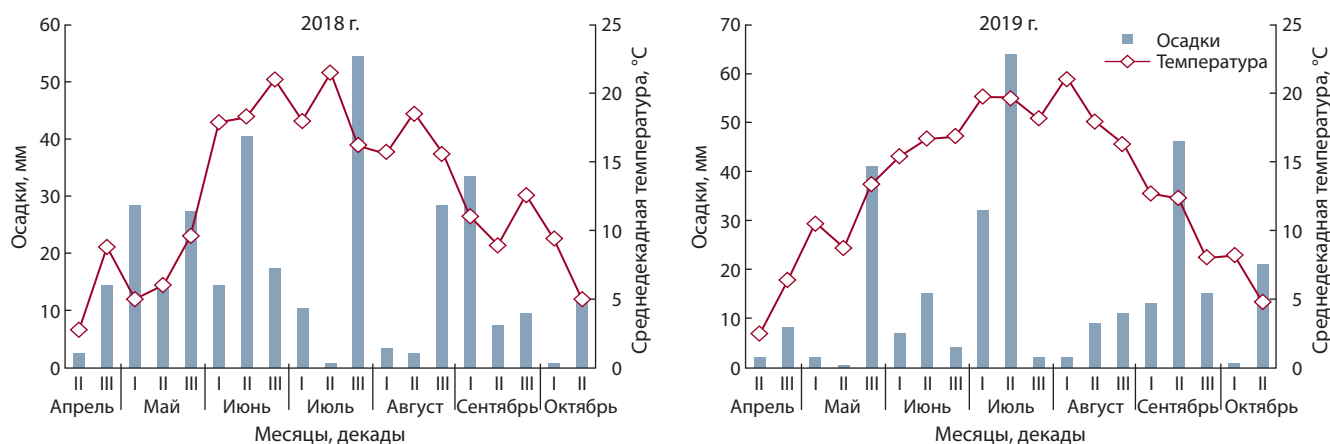


Рис. 1. Гидротермические условия вегетационных периодов 2018 и 2019 гг.

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа двухфакторного опыта по изучению влияния на число побегов *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста ризомов

| Освещенность участка (A) | Возраст ризомов (B) | Число побегов, повторности | | | |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| | | I | II | III | IV |
| A ₀ | B ₀ | 8.3 | 12.0 | 8.0 | 8.8 |
| | B ₁ | 22.8 | 26.0 | 27.5 | 32.0 |
| A ₁ | B ₀ | 6.8 | 8.3 | 15.0 | 14.3 |
| | B ₁ | 20.5 | 29.3 | 28.3 | 56.3 |
| Дисперсия | Сумма квадратов | Степени свободы | Средний квадрат | F _{факт} | F _{0.5} |
| Общая | 2555.3 | 15 | — | — | — |
| Освещенности участка A | 69.7 | 1 | 69.7 | 1.0 | 4.75 |
| Возраста ризомов B | 1624.1 | 1 | 1624.1 | 22.7 | 4.75 |
| Взаимодействия AB | 4.1 | 1 | 4.1 | 0.1 | 4.75 |
| Остаток (ошибки) | 857.4 | 12 | 71.5 | — | — |

му отрастанию. Далее у растений с хорошо развитой и успешно перезимовавшей подземной побеговой системой формировалась надземная часть, напоминающая явнополицентрическую биоморфу: на плагитропных побегах этого вида образуются диаспоры, в момент появления собственной корневой системы они закрепляются, сохраняя связь с материнской особью.

В июне температура медленно, без перепадов, повышалась (см. рис. 1). Процесс кушения происходил с июля (особенно в период максимального выпадения осадков) до начала августа. Растения во всех вариантах сформировали за вегетационный период большее число побегов по сравнению с 2018 г. Во второй половине августа активность процесса кушения изменилась в связи с понижением температуры и влажности ниже нормы (22 мм осадков, или 33 % от нормы). Растения в таких условиях переходят к генеративному развитию. В это время наблюдается активное удлинение побегов за счет вытягивания полого

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа двухфакторного опыта по изучению влияния на высоту растений *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста ризомов

| Освещенность участка (A) | Возраст ризомов (B) | Высота растений, повторности | | | |
|--------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| | | I | II | III | IV |
| A ₀ | B ₀ | 96.5 | 116.0 | 107.8 | 136.3 |
| | B ₁ | 115.5 | 140.3 | 172.3 | 175.0 |
| A ₁ | B ₀ | 112.3 | 138.5 | 129.5 | 130.3 |
| | B ₁ | 139.0 | 166.3 | 182.0 | 190.8 |
| Дисперсия | Сумма квадратов | Степени свободы | Средний квадрат | F _{факт} | F _{0.5} |
| Общая | 12394.4 | 15 | — | — | — |
| Освещенности участка A | 6162.2 | 1 | 6162.2 | 14.3 | 4.75 |
| Возраста ризомов B | 1040.1 | 1 | 1040.1 | 2.4 | 4.75 |
| Взаимодействия AB | 27.6 | 1 | 27.6 | 0.1 | 4.75 |
| Остаток (ошибки) | 5164.5 | 12 | 430.4 | — | — |

цветоноса, образование верхнего «флагового» листа и появление соцветий – метелок; соответственно, сокращается нарастание вегетативной массы побегов.

Для выявления влияния на побегообразование *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста растений в 2018 и 2019 гг. был проведен дисперсионный анализ двухфакторного опыта (табл. 2 и 3). На число образовавшихся побегов существенно влияет фактор возраста ризомов (B), а экологические условия (A) и взаимодействие факторов (AB) – несущественно (см. табл. 2). На высоту растений существенное влияние оказывает фактор экологических условий (A), тогда как возраст ризомов (B) и взаимодействие факторов (AB) влияют несущественно (см. табл. 3).

Таким образом, в результате дисперсионного анализа (см. табл. 2, при F = 0.5) обнаружено, что число побегов сильно зависит от фактора возраста ризомов (B 22.7 > 4.75), но не от экологических условий, а высота

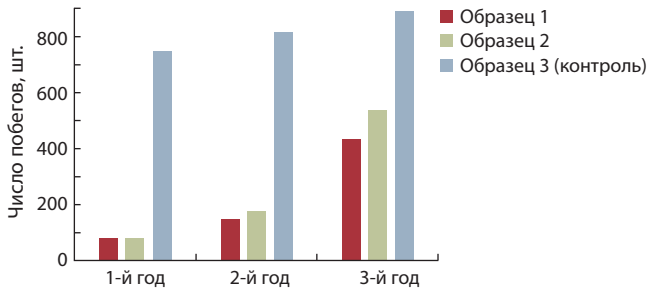


Рис. 2. Особенности побегообразования образцов *M. sacchariflorus* в различных экологических условиях.

Образец 1 – полутенистый участок; образец 2 – открытый участок; образец 3 (контроль) – многолетние посадки, куртина.

растений в большей степени зависит от экологических условий ($A_{14.3} > 4.75$), но не от возраста (см. табл. 3).

Контрольный образец представлял сплошную многолетнюю куртину, расположенную на освещенном месте. У контрольных растений, ранее сформировавших плотную куртину, отмечалось незначительное увеличение числа побегов (рис. 2). У молодых растений, изначально представленных ризомами, напротив, наблюдалось интенсивное побегообразование на второй и третий годы жизни. Растения *M. sacchariflorus* на полутенистых участках уже на второй год жизни образовывали до 89.34 % побегов в сравнении с освещенными участками (см. рис. 2).

Однако образец 1, произрастающий в тени, по количеству побегов на второй (148) и третий (433) годы жизни отстает от образца 2 (177 и 537 побегов соответственно). Более высокая освещенность стимулирует кущение у растений образца 2, что приводит к быстрому смыканию отдельно высаженных растений.

Менее интенсивное кущение наблюдалось у образца 1 в полутени, но и в этом случае проективное покрытие на третий год жизни оказалось достаточно высоким – от 65 до 75 %. Образец 3 произрастает на одном месте более 15 лет. Отмечено, что растения ежегодно активно растут и развиваются, деградации не наблюдается. Проективное покрытие составило более 70 %. Однако возможности интенсивного побегообразования практически исчерпаны, поэтому в 2019 г. увеличение числа побегов по сравнению с 2018 г. составило лишь 9.06 % (816 и 890 шт.), тогда как у образца 1 на полутенистом участке – 192.57 % (148 и 433 шт.), а у образца 2 на освещенном участке – 203.40 % (177 и 537 шт.).

Химический анализ этих трех образцов, выполненный на материале *M. sacchariflorus* 2019 г. отдельно на стеблях (поскольку целлюлоза стебеля ценится выше) и листьях, показал, что содержание целлюлозы в полутени (50.9 %) выше, чем на освещенном участке (50.1 %), а пониженное (на 12 %) содержание технологически нежелательного компонента (лигнина) отмечено на наименее хозяйственно ценном полутенистом участке (табл. 4). Это связано с тем, что дифференциация тканей побегов, включая одревеснение, более интенсивно происходит в условиях достаточной освещенности.

Массовая доля целлюлозы в листе независимо от условий освещенности (40.2 % в полутени и 42.2 % на открытом участке) значительно ниже, чем в стебле, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами (Гисматулина и др., 2019). Аналогично стеблю, массовая доля лигнина в листе на 7.6 % ниже в полутени, чем на открытом участке. Массовые доли пентозанов, ЖВФ и золы находятся примерно на одном уровне как в стебле, так и в листе, независимо от условий освещенности плантации.

Таблица 4. Химический состав трех образцов *M. sacchariflorus* 2019 г.

| Химико-технологический показатель | Образец 1, полутенистый участок | Образец 2, открытый участок | Образец 3 (контроль), многолетние посадки |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---|
| Стебель | | | |
| Масса, г | 339 | 295 | 294 |
| Влажность, % | 5.7 ± 0.1 | 5.8 ± 0.1 | 5.7 ± 0.1 |
| Зола, % | 1.91 ± 0.05 | 1.60 ± 0.05 | 1.48 ± 0.05 |
| Лигнин, % | 18.7 ± 0.1 | 21.3 ± 0.1 | 25.5 ± 0.1 |
| Целлюлоза по Кюршнеру, % | 50.9 ± 0.1 | 50.1 ± 0.1 | 52.0 ± 0.1 |
| Пентозаны, % | 23.2 ± 0.1 | 23.9 ± 0.1 | 22.1 ± 0.1 |
| ЖВФ, % | 0.8 ± 0.1 | 1.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 |
| Лист | | | |
| Масса, г | 180 | 134 | 134 |
| Влажность, % | 9.3 ± 0.1 | 7.5 ± 0.1 | 7.5 ± 0.1 |
| Зола, % | 4.74 ± 0.05 | 4.83 ± 0.05 | 4.83 ± 0.05 |
| Лигнин, % | 20.1 ± 0.1 | 21.7 ± 0.1 | 21.7 ± 0.1 |
| Целлюлоза по Кюршнеру, % | 40.2 ± 0.1 | 42.2 ± 0.1 | 42.2 ± 0.1 |
| Пентозаны, % | 23.8 ± 0.1 | 23.3 ± 0.1 | 23.3 ± 0.1 |
| ЖВФ, % | 1.9 ± 0.1 | 1.8 ± 0.1 | 1.8 ± 0.1 |

Примечание. ЖВФ – жировосковая фракция; полуширина доверительного интервала определена при уровне значимости 0.05.

В результате электрофореза ПЦР-продуктов геномной ДНК в популяции *M. sacchariflorus*, полученных при амплификации с пятью выбранными ISSR-праймерами, был обнаружен высокий генетический полиморфизм исследуемых объектов (рис. 3).

Для каждой популяции, в зависимости от использованного праймера, было выявлено от одного до четырех эффективных стабильных молекулярных маркеров – уникальных ПЦР-фрагментов, отсутствующих у остальных популяций (табл. 5). Длина полиморфных фрагментов при ISSR-анализе варьировала от 660 до 2000 п. н. Обнаруженные уникальные молекулярные полиморфные фрагменты, представляющие собой последовательности определенной длины, были выбраны для паспортизации популяции *M. sacchariflorus*.

Таким образом, принимая во внимание генетическую формулу, предложенную для *Rhododendron canadense* (Новикова и др., 2012), генетическая формула для популяции *M. sacchariflorus* будет выглядеть следующим образом: ISSR/(CA)₆AG-925,980/(CT)₈GC-600,690,780,940/(CT)₈TG-1060/(CT)₈AC-690,800,1030,1390/(AC)₈YG-650,975,1470,2000.

Обсуждение

Изучение особенностей побегообразования *M. sacchariflorus*, интродуцированного в ЦСБС СО РАН в условиях континентального климата Западной Сибири, показало, что для выращивания этого вида в качестве биоэнергетической культуры нежелателен ранний переход растений к генеративному развитию, так как происходит остановка накопления биомассы. Установлено, что у данного злака достаточно длинный период активного роста. При этом следует учесть, что в рост такое растение трогается лишь после того, как воздух прогреется до 25 °С. У экспериментальных растений на третий год жизни проективное покрытие надземной фитомассы в трех повторностях варьировало от 70 до 80 %.

По результатам дисперсионного анализа можно заключить, что число побегов зависит от возраста растений, а влияние на этот показатель экологических условий и взаимодействия факторов незначительно. На высоту растений, напротив, существенное воздействие оказывают экологические условия, а возраст и взаимодействие этих факторов практически не влияют. В связи с этим важным этапом при изучении побегообразования злаков является

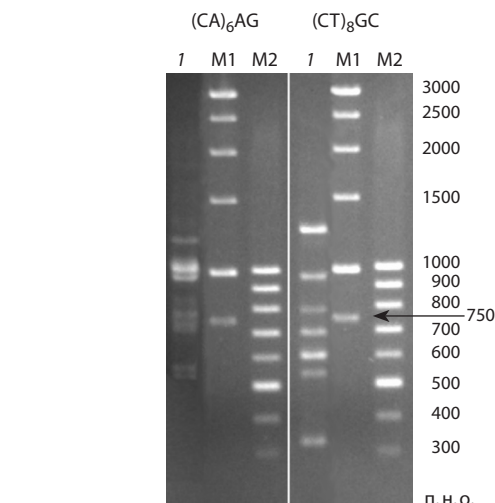


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации популяции мискантуса с двумя ISSR-праймерами: (CA)₆AG и (CT)₈GC.
1 – *M. sacchariflorus* (обр. 1); M1 и M2 – маркеры молекулярного веса.

переход растений к кущению, который исследователи связывают либо с началом роста боковых побегов в зоне укороченных междоузлий (Langer, 1963; Смелов, 1966), либо с началом роста этой зоны (Добрынин, 1969; Горчакова, 2003).

Необходимо также отметить, что массовая доля в стебле технологически значимого компонента – целлюлозы – не изменяется в зависимости от условий освещенности (50.9 % в полутени и 50.1 % на открытом участке). В то же время массовая доля лигнина, отрицательно сказывающегося на технологических процессах, ниже в полутени на 12 %. С увеличением возраста плантаций *M. sinensis* Andersson var. (рассматривался сорт Сорановский) урожайность биомассы возросла с 2.1 до 14.9 т/га, а содержание целлюлозы в биомассе – с 42 до 54 % (Gismatulina, Budaeva, 2017).

Таким образом, в результате многолетних исследований обнаружено, что высокий адаптивный потенциал *M. sacchariflorus*, высокое содержание целлюлозы (52.04 %) при относительно небольшом содержании лигнина (21.3 %) позволяют использовать популяцию этого вида в качестве средоулучшающей и технической биоэнергетической культуры.

Таблица 5. Характеристика ISSR-маркеров, использованных при составлении молекулярно-генетической формулы в популяции *M. sacchariflorus*

| Праймер 5'–3' | Количество маркеров* | Длина полиморфных фрагментов, п. н. |
|----------------------|----------------------|--|
| (CA) ₆ AG | 2/8 (25 %) | (CA) ₆ AG ₉₂₅ , (CA) ₆ AG ₉₈₀ |
| (CT) ₈ GC | 4/7 (57 %) | (CT) ₈ GC ₆₀₀ , (CT) ₈ GC ₆₉₀ , (CT) ₈ GC ₇₈₀ , (CT) ₈ GC ₉₄₀ |
| (CT) ₈ TG | 1/3 (33 %) | (CT) ₈ TG ₁₀₆₀ |
| (CT) ₈ AC | 4/7 (57 %) | (CT) ₈ AC ₆₉₀ , (CT) ₈ AC ₈₀₀ ** , (CT) ₈ AC ₁₀₃₀ , (CT) ₈ AC ₁₃₉₀ |
| (AC) ₈ YG | 4/13 (31 %) | (AC) ₈ YG ₆₅₀ , (AC) ₈ YG ₉₇₅ , (AC) ₈ YG ₁₄₇₀ ** , (AC) ₈ YG ₂₀₀₀ |

* В знаменателе указано общее количество маркеров; в числителе – количество маркеров, уникальных для популяции; в скобках – их процентное соотношение.

** ISSR-маркеры со слабым флуоресцирующим сигналом.

Для генетической паспортизации этой перспективной популяции было выбрано пять ISSR-маркеров. На основании проведенных нами исследований и результатов, представленных другими авторами, можно заключить, что ISSR-праймеры являются полиморфными и могут использоваться для идентификации образцов, популяций, видов, а также для составления генетических формул и паспортов не только рода *Miscanthus*, но и других видов и сортов (Боронникова, 2009; Артюхова и др., 2010; Новикова и др., 2012; Лебедев и др., 2018). И.А. Клименко с коллегами провели идентификацию и паспортизацию сортов клевера с помощью SSR- и SRAP-маркеров и предложили набор ДНК-идентификационных маркеров (Клименко и др., 2020). Данные, полученные с помощью анализа ДНК, наиболее объективны для описания сортов и видов растений, так как в меньшей степени подвержены генотипической изменчивости и в большинстве случаев имеют кодоминантный тип наследования (Рамазанова, Коломыцева, 2020).

Генетический паспорт *M. sacchariflorus*, приведенный нами в виде генетической формулы, составленной на основе амплифицированной ДНК, содержит сведения об использованном методе, праймерах и обнаруженных у изучаемого образца амплифицированных фрагментах ДНК. При необходимости усовершенствования формы записи молекулярно-генетической формулы указывается тип фрагмента (родовой, видовой, полиморфный), как это предложено в работе (Боронникова, 2009). В целом по молекулярно-генетической формуле для популяции *M. sacchariflorus* можно установить принадлежность отдельных особей не только к роду, виду и сорту, но и к определенной популяции.

Заключение

В результате проведенных нами исследований обнаружено, что *M. sacchariflorus* способен успешно произрастать на малоплодородных полутенистых участках, причем содержание лигнина к моменту заготовки сырья в этих микроэкологических условиях будет пониженным.

Высокое проективное покрытие в различных экологических условиях, а также долговечность клонов указывают на перспективы фитомелиоративного использования отборных форм данного вида в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. Содержание целлюлозы в стебле – важнейшего компонента при оценке растения в качестве технического сырья, незначительно изменяется в зависимости от условий освещенности, а содержание лигнина, отрицательно влияющего на технологические процессы, оказалось ниже у растений, выращенных в полутени.

На основании полученной молекулярно-генетической формулы для популяции *M. sacchariflorus* возможно усовершенствование формы записи с указанием типа фрагмента, характеризующего принадлежность отдельных особей не только к роду и виду, сортовой популяции и сорту, но и к определенной популяции.

Паспортизация с помощью молекулярно-генетических маркеров перспективных форм мискантуса и разработка научных и практических рекомендаций и комплекса приемов возделывания открывают возможности для исполь-

зования представителей этого рода в селекции в условиях континентального климата Западной Сибири.

Создание сортов путем размножения перспективных форм, представляющих интерес в качестве сырьевых растений, и их молекулярно-генетическая идентификация позволяют рекомендовать представителей рода *Miscanthus* в качестве экологически чистого и возобновляемого растительного сырья, перспективного для реализации программы альтернативной биоэнергетики в Западной Сибири.

Список литературы / References

- Анисимов А.А., Хохлов Н.Ф., Тараканов И.Г. Особенности фотопериодической регуляции онтогенеза у различных видов мискантуса (*Miscanthus* spp.). *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2016; 6:56-72.
- [Anisimov A.A., Khokhlov N.F., Tarakanov I.G. Photoperiodic regulation of ontogenesis in different *Miscanthus* species (*Miscanthus* spp.). *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2016;6:56-72. (in Russian)]
- Артюхова А.В., Гришин С.Ю., Лукашевич М.И., Заякин В.В., Нам И.Я. Разработка метода паспортизации сортов люпина. *Вестн. Брян. гос. ун-та*. 2010;4:81-84.
- [Artyukhova A.V., Grishin S.Yu., Lukashovich M.I., Zayakin V.V., Nam I.Ya. Development of a method for Lupinus variety certification. *Vestnik Bryanskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Herald of the Bryansk State University*. 2010;4:81-84. (in Russian)]
- Бобошина И.В., Боронникова С.В. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Пат. на изобр. RU 2505956 C2. Опубл. 10.02.2014. Бюл. № 4.
- [Boboshina I.V., Boronnikova S.V. Method of molecular-genetic identification of woody plant species populations. Patent for invention RU 2505956 C2. Publ. 10.02.2014. Bull. 4. (in Russian)]
- Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2009;1:82-88.
- [Boronnikova S.V. Genetic certification of populations of rare *Adonis* species using ISSR and IRAP markers. *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2009;1:82-88. (in Russian)]
- Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Сакович Г.В., Васильева О.Ю., Зуева Г.А., Гусар А.С., Дорогина О.В. Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569.
- [Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V., Vasilyeva O.Yu., Zueva G.A., Gusar A.S., Dorogina O.V. Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569.]
- Горчакова А.Ю. Новое о ветвлении злаков. *Бюл. Бот. сада Кубанского гос. агр. ун-та*. 2003;21:39-40.
- [Gorchakova A.Yu. New about the branching of cereals. *Bulleten Botanicheskogo Sada Kubanskogo Gosudarstvennogo Agronomicheskogo Universiteta = Bulletin of the Botanical Garden of the Kuban State Agrarian University*. 2003;21:39-40 (in Russian)]
- Добрынин Г.М. Рост и формирование хлебных и кормовых злаков. Л.: Колос, 1969.
- [Dobrynin G.M. Growth and Formation of Bread and Fodder Cereals. Leningrad: Kolos Publ., 1969. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985.
- [Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiments with the Fundamentals of Statistical Processing of Results, 5th revised edition. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

- Калаев В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко К.А., Кондратьева А.М., Вепринцев В.Н., Карпеченко Н.А., Карпова С.С., Моисеева Е.В., Баранова Т.В. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода *Rhododendron* с целью их паспортизации. *Фундам. исследования*. 2012;6(2):323-328. [Kalayev V.N., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko I.Yu., Karpechenko K.A., Kondratyeva A.M., Veprintsev V.N., Karpechenko N.A., Karpova S.S., Moiseeva E.V., Baranova T.V. The use of molecular genetic analysis methods to study DNA polymorphism in plants of the genus *Rhododendron* for the purpose of their certification. *Fundamentalnye Issledovaniya = Fundamental Research*. 2012;6(2):323-328. (in Russian)]
- Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав на основе ДНК-маркеров: Метод. рекомендации. М.: Угрешат, 2020. [Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and Certification of Forage Grass Varieties Based on DNA Markers: Recommended Practice. Moscow: Ugreshat Publ., 2020. (in Russian)]
- Лебедев В.Г., Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина Е.О., Позднякова И.А., Шестибратов К.А. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники. *Селекция и сорторазведение садовых культур*. 2018; 5(1):65-68. [Lebedev V.G., Subbotina N.M., Kirkach V.V., Vidyagina E.O., Pozdnyakova I.A., Shestibratov K.A. Analysis of microsatellite loci as the first step in the marker-assisted selection of raspberry and strawberry. *Seleksiya i Sortorazvedenie Sadovykh Kultur = Breeding and Variety Cultivation of Horticultural Crops*. 2018;5(1):65-68. (in Russian)]
- Новикова А.А., Шейкина О.В., Новиков П.С., Доронина Г.У. Оценка возможности применения ISSR-маркеров для систематизации и генетической паспортизации растений рода *Rhododendron*. *Политемат. сетевой электрон. науч. журн. Кубанского гос. аграр. ун-та*. 2012;82:79-89. [Novikova A.A., Sheikina O.V., Novikov P.S., Doronina G.U. Assessment of the possibility of using ISSR markers for the systematization and genetic certification of plants of the genus *Rhododendron*. *Politematicheskij Setevoy Elektronnyy Nauchnyy Zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Polythematic Scientific Online Journal of the Kuban State Agrarian University*. 2012;82:79-89. (in Russian)]
- Оболеская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учеб. пособие для вузов. М.: Экология, 1991. [Obolenskaya A.V., Elnitskaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratory Work on the Chemistry of Wood and Cellulose: Textbook for universities. Moscow: Ecology Publ., 1991. (in Russian)]
- Рамазанова, Коломыцева А.С. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК. *Масличные культуры*. 2020;1:42-48. [Ramazanova S.A., Kolomytseva A.S. Optimization of soybean genotyping process using analysis of a polymorphism of SSR-loci in DNA. *Maslichnye Kultury = Oil Crops*. 2020;1:42-48. (in Russian)]
- Слынько Н.М., Горячковская Т.Н., Шеховцов С.В., Банникова С.В., Бурмакина Н.В., Старостин К.В., Розанов А.С., Нечипоренко Н.Н., Вепрев С.Г., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Биотехнологический потенциал новой технической культуры – Мискантус сорт Сорановский. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/1):765-771. [Slyn'ko N.M., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Bannikova S.V., Burmakina N.V., Starostin K.V., Rozanov A.S., Nechiporenko N.N., Veprev S.G., Shumny V.K., Kolchanov N.A., Pel'tek S.E. The biotechnological potential of the new crops, *Miscanthus* cv. Soranovskii. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/1):765-771. (in Russian)]
- Смелов С.П. Теоретические основы луговодства. М.: Колос, 1966. [Smelov S.P. Theoretical Foundations of Meadow Farming. Moscow: Kolos Publ., 1966. (in Russian)]
- Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018;10(1):69-84. DOI 10.31301/2221-6197.bmc.2018-15. [Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomika = Biomics*. 2018;10(1):69-84. DOI 10.31301/2221-6197.bmc.2018-15. (in Russian)]
- Челюстикова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Микросателлитные локусы для идентификации сортов льна масличного селекции ВНИИМК: подбор информативных праймеров и оптимальных условий ПЦР ДНК. *Масличные культуры*. 2019;2:41-46. [Chelyustnikova T.A., Guchetl S.Z., Antonova T.S. Microsatellite loci for identification of oil flax varieties of the breeding of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops: selection of informative primers and optimal conditions for DNA PCR. *Maslichnye Kultury = Oil Crops*. 2019;2:41-46. (in Russian)]
- Dohleman F.G., Long S.P. More productive than maize in the midwest: how does *Miscanthus* do it? *Plant. Physiol.* 2009;50(4):2104-2115.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13-15.
- Ganieva S.H., Upadhyaya P., Maheshwer S.D., Sharmab P. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*. 2015;4: 83-99. DOI 10.1016/j.plgene.2015.10.002.
- Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Ind. Crops Prod*. 2017;109:227-232. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.08.026.
- Langer R.H.M. Tillering in herbage grasses. *Herb. Abstr.* 1963;33(3): 141-148.
- Naem R. Molecular markers in plant genotyping. *J. Bio-Mol. Sci.* 2014;2(3):78-85.
- Naidu S.L., Moose S.P., Al-Shoaibi A.K., Raines C.A., Long S.P. Cold tolerance of C₄ photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C₄ photosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* 2003;132:1688-1697. DOI 10.1104/pp.103.021790.
- Wallinger C., Juen A., Staudacher K., Schallhart N., Mitterrutzner E., Steiner E.-M., Thalinger B., Traugott M. Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS One*. 2012;7(1):e29473. DOI 10.1371/journal.pone.0029473.

ORCID ID

O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594
N.S. Nuzhdina orcid.org/0000-0002-0634-8820

G.A. Zueva orcid.org/0000-0001-7950-054X
Yu.A. Gismatulina orcid.org/0000-0001-5480-7449
O.Yu. Vasilyeva orcid.org/0000-0003-0730-3365

Благодарности. Исследования выполнены по комплексной программе фундаментальных научных исследований СО РАН по проекту «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (номер гос. регистрации АААА-А21-121011290025-2), с использованием материалов биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534 и при финансовой поддержке проекта FSU5-2021-0012 «Экосистемы травяных сосновых и мелколиственных лесов как регуляторы азотного и углеродного баланса в лесостепном ландшафте Западной Сибири».

Исследования по химическому составу выполнены в рамках госзадания ИПХЭТ СО РАН «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.04.2021. После доработки 26.07.2021. Принята к публикации 26.07.2021.