

## ВОЗМОЖНОСТИ УСКОРЕННОГО ТИРАЖИРОВАНИЯ *FRAXINUS SOGDIANA* С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЛИКТОВОГО ДЕРЕВА С ПОМОЩЬЮ ДНК-БАРКОДИРОВАНИЯ

Амангельдинова М.К.<sup>1\*</sup>, Беккужина С.С.<sup>1,2</sup> , Жұмабай Н.Б.<sup>1,2</sup> , Түсіпқан Д.<sup>2</sup> , Манабаева Ш.А.<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина, 010011, Казахстан, Астана, пр. Женис, 62,

<sup>2</sup> Национальный центр биотехнологии 010000, Казахстан, Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5

\* Автор для корреспонденции: madina.27.09@mail.ru

### АБСТРАКТ

В Казахстане произрастают четыре вида *Fraxinus*: *F. angustifolia* subsp. *syriaca* (Boiss.) Yalt., *F. sogdiana* Bunge, *F. pennsylvanica* Marshall и *F. americana* L. В данной работе определены условия пробуждения из эндогенного покоя в условиях *in vitro* *Fraxinus sogdiana*. На контрольных вариантах, т. е. без яровизации выход стерильной культуры при комнатной температуре составил 30%, в то время как при холодной обработке этот показатель составил 60%, то есть в два раза выше. Отмечено, что при микроклональном размножении из семян без поранений на среде MS без добавления гормонов получено 22 микропобега, в то время как из пораненных семян, получено 39 микропобегов. Филогенетические взаимосвязи и идентификация видов проанализированы с использованием трех ДНК-маркеров, сравнивая *F. sogdiana* с видами из базы данных NCBI. ДНК-баркоды *rbcL*, ITS не показали удовлетворительную межвидовую генетическую изменчивость среди видов *Fraxinus*. Однако, последовательности гена *matK* эффективно отличают *F. sogdiana* от других видов и результаты могут быть полезными для биотехнологических и молекулярных исследований по идентификации видов.

**Ключевые слова:** *Fraxinus sogdiana*, культура *in vitro*, микроклональное размножение, ДНК-баркодирование, *rbcL*, ITS

### ВВЕДЕНИЕ

Род *Fraxinus* L. насчитывает 58 видов и является одним из крупнейших родов семейства *Oleaceae*, и семейство включает 27 родов и 687 видов. Большинство видов *Fraxinus* представляют собой листопадные деревья и кустарники [1, 2]. В основном *Fraxinus* растет в лесах умеренного пояса и лесах Северного полушария, от Северной Америки до Европы и от Ближнего Востока до Китая и Японии [3]. Несколько видов можно найти в тропических регионах Центральной Америки, Индии и некоторых частях Индокитая, а два вида встречаются в Северной Африке [4, 5].

*Fraxinus sogdiana* - редкий, реликтовый вид, с дизъюнктивным ареалом распространения. Вид занесен в Красную книгу Казахстана (Красная книга, 2014) [6]. Выявлена основная особенность анатомического строения листьев и наличие крупных специальных двигательных клеток в верхнем и нижнем эпидермисе. Исследование фитохимического состава показывает о присутствии в *Fraxinus* 10 важнейших биологически активных веществ, обладающих антимикробными, противоопухолевыми, мочегонными и антиоксидантными свойствами [7, 8].

Коммерческий успех, а также экологическая и экономическая выгода культивирования *Fraxinus sogdiana* известны в Европейском союзе с начала 2000-х годов [9, 10]. Одним из важных моментов использования *Fraxinus* является заготовка древесины, а также некоторые виды привлекают внимание лечебными свойствами и находят применение, как в народной, так и в современной медицине. *Fraxinus* используется в качестве мочегонных и легко слабительных препаратов. Например, в Китае племена Ли-шу, Мяо и Ва используют корни, как жаропонижающее, противомаларийное, противоринитное и противовос-

палительное средство, а также как средство при инфекционных заболеваниях. Племя Хань использует кору того же вида при лечении стоматита, зубной боли и инфекций мочевыводящих органов [11].

Кроме того, виды *Fraxinus* важны для ландшафтного дизайна и лесоразведения [12], а также есть виды *Fraxinus* широко используемые, как декоративные растения [11].

Биохимические особенности *Fraxinus* отличаются содержанием кумаринов, секойридоидов и фенилэтанолов, секойридоиды встречаются преимущественно в виде глюкозидов и эфиров гидроксифенилэтиловых спиртов, а фенольные соединения присутствуют в ограниченном количестве. Наличие кумаринов отличает род *Fraxinus* от других родов *Oleaceae*. Традиционно данное растение хорошо изучено по кумаринам [11].

В последние годы возрос интерес к фитохимии *Fraxinus* и это связано с открытием секойридоидных глюкозидов, которые составляют основные метаболиты рода и семейства *Oleaceae* [11].

Семена ясеня состоят из твердой деревянистой кожицы и имеют длительный период покоя, что затрудняет прорастание [13]. Решением проблемы может выступать использование технологии микроклонального размножения (МКР), основанного на методах культивирования клеток и тканей. МКР имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами воспроизведения растительных организмов, и отличается высоким коэффициентом воспроизводства, малыми площадями, необходимыми для процесса, улучшением посадочного материала, а также возможностью длительного депонирования проб с меньшими затратами на хранение. При размножении в условиях *in vitro* появилась возможность не только размножать и укоренять трудно воспроизводимые традиционным спо-

собом растения, но и получить достаточное количество биоматериала для размножения редких и исчезающих видов растений [14].

Размножение *in vitro* посредством микроразмножения пазушными побегами, органогенеза адвентивных побегов или соматического эмбриогенеза является многообещающим для некоторых видов ясеня [15].

У *Fraxinus* пазушные побеги индуцировали с использованием апикальных сегментов от 13-месячных до 16-летних растений. Адвентивные побеги индуцированы из гипокотилей эмбрионов и эксплантов листьев. Побеги *Fraxinus* можно укоренять на обогащенной ауксином среде или методом «импульсной» обработки, то есть на обогащенной ауксином среде в течение нескольких дней с последующим переносом в среду не содержащую ауксина [16].

ДНК-баркодирование с 2003 года применяется для идентификации видов, определения экологических и эволюционных взаимосвязей между видами, а также ускорения таксономических открытий. Стандартизированный ДНК-баркод представляет собой короткий (<1000 п.н.), и дивергентный участок ДНК и является эффективным инструментом для изучения биологического разнообразия [17]. В 2009 году проведены исследования царства растений рабочей группой CBOL, где изучено 907 образцов 445 покрытосеменных, 38 голосеменных и 67 видов криптогам. Кроме того, просеквенированы по семи участкам пластомной ДНК, кандидатов в баркоды (межгенный спейсер *atpF-atpH*, ген *matK*, ген *rbcL*, ген *rpoB*, ген *rpoC1*, межгенный спейсер *psbK-psbI* и межгенный спейсер *trnH-psbA*). Далее было выявлено, что четыре участка первичных генов *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* и ITS приняты в качестве стандартизированных универсальных ДНК-баркодов для изучения всех видов растений. Данные исследования способствовали реализации платформы по созданию централизованной базы данных ДНК-баркодов (CBOL Plant Working Group, 2009).

В настоящее время во всем мире отмечается прогресс в применении ДНК-баркодов для всех групп растений, и достаточное количество научных публикации, которые позволяют оценить, реализовать, сохранить и использовать ДНК-баркодирование для идентификации биоразнообразия. ДНК-баркодирование также используется для сохранения зародышевой плазмы, создания сообществ, сетей взаимодействия видов и оценки приоритетных областей охраны окружающей среды [18, 19]. Известно, что 634 инвазивных видов растений из Китая и всего мира изучены с использованием пяти распространенных ДНК-баркодов (ITS, ITS2, *matK*, *rbcL* и *trnH-psbA*) [20]. 1130 образца 538 вида, 323 рода и 115 семейств сосудистых растений из чрезвычайно разнообразной флоры в

Серра-дус-Каражас, в Восточной Амазонии, с использованием восьми различных ДНК-маркеров (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA* и ITS2) баркодированы и наиболее оптимальными рекомендованы *rbcL* и ITS2 [21]. Из гербарного материала флоры Великобритании 1482 вида цветковых растений баркодированы с использованием маркеров *rbcL*, *matK* и ITS2 [22]. Исследования за последние годы проведенные в разных регионах мира в очередной раз подчеркивают актуальность и значимость использования метода ДНК-баркодирования, особенно общепринятых ДНК-баркодов (*rbcL*, ITS, *matK*), в изучении видов растений.

Метод ДНК-баркодирования использовали для идентификации растений рода *Fraxinus*. Ранее проводились исследования филогении рода *Fraxinus* по ядерным нуклеотидным последовательностям ITS [23, 24]. Wallander и др., так же изучали данный род по хлоропластным маркерам *rps16*, *trnL-F* и определили 6 секции (*Dipetaleae*, *Fraxinus*, *Melioides*, *Ornus*, *Pauciflorae* и *Sciadanthus*) [23].

В настоящее время изучены филогения и биогеографическая история рода *Fraxinus*, на основе ядерных рибосомальных спейсеров *ETS* и ITS [5]. Согласно базе данных NCBI, доступны полногеномные секвенирования хлоропластов видов *Fraxinus* включая *F. pennsylvanica*, *F. chiisanensis*, *F. malacophylla*, *F. chinensis*, *F. insularis*, *F. mandshurica*, *F. nigra*, *F. sieboldiana*, *F. velutina*, *F. lanuginosa*, *F. americana*, *F. latifolia*, *F. quadrangulata*, *F. xanthoxyloides*, *F. Angustifolia* [25-28].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использовали семена ясеня согдийского, полученные из Чарынского национального парка (горная местность каменистая почва) 43°32'13" с.ш. и 79°17'15" в.д.). Результаты по морфометрическим показателям размножения ясеня опубликованы нами ранее, в данной работе акцентируется внимание выведению семян ясеня из глубокого эндогенного покоя, и данный факт определяет успех дальнейшего ускоренного размножения [29].

Далее представляло интерес изучить отличие *Fraxinus sogdiana* от других видов с помощью ДНК-маркеров.

**Яровизация семян.** Для ускоренного выведения семян *Fraxinus* из состояния покоя использовали холодовую обработку, помещая семена в камеру со снегом при температуре +4°C. В качестве контроля семена при комнатной температуре хранились в фитокамере «Binder» +20°C.

**Стерилизация семян.** Основным требованием культивирования клеток, тканей и органов в *in vitro* является строгое соблюдение асептических условий. Стерилизацию эксплантов проводили в 3 этапа с дальнейшим про-

Таблица 1. Режим стерилизации семян *Fraxinus sogdiana*

Стерилизующий агент	Время экспозиции
Концентрированный мыльный раствор	5 минут
Раствор перманганата калия	3 минуты / 5 минут
50% раствор гипохлорита натрия	3 минуты / 5 минут
*После каждого этапа растительный материал промывался 3 раза по 1 минуте дистиллированной водой	

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для ДНК-баркодирования

Название праймера	Нуклеотидные последовательности праймеров	Локус баркодирования	Т отжига (°C)	Источник
3F_KIMf	5' – CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG – 3'	<i>matK</i>	50	[34]
1R_KIMr	5' – ACCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTC – 3'	<i>matK</i>	50	[34]
rbcLa_F	5' – ATGTCACCAACAAACAGAGACTAAAGC – 3'	<i>rbcL</i>	58	[35]
rbcLa_R	5' – GTAAAATCAAGTCCACCRCG – 3'	<i>rbcL</i>	58	[35]
ITS4	5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	ITS1 и ITS2	55	[36]
ITS5	5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG – 3'	ITS1 и ITS2	55	[36]

мыванием от стерилизующих агентов стерильной дистиллированной водой. В Таблице 1 показаны время экспозиции семян и виды стерилизующих веществ.

**Введение в культуру *in vitro*.** В качестве питательных сред использовали два вида: Murashige and Skoog medium (MS) [30] и Driver & Kuniyuki Walnut medium (DKW) [31]. В питательные среды добавляли фитогормоны – 6-бензиламинопури (6-БАП) и кинетин в концентрации 2 мг/л. Введение в культуру *in vitro*, осуществлялось после последнего этапа стерилизации гипохлоритом натрия в условиях ламинар бокса. Для введения в культуру *in vitro* в качестве экспланта использовались семена *Fraxinus sogdiana*. Через одну неделю культивирования, с помощью поранения семя (сегмент около 1-3 мм) переносили на свежую питательную среду.

**Микроклональное размножение.** Для дальнейшего размножения микропобегов, растения переносили на среды MS и DKW с добавлением фитогормонов 6-БАП и кинетин, а также проводили чередование среды без гормональной добавки. Черенкование проводили каждые 4 недели культивирования. Режим культивирования – фотопериод 16/8, температура в фитокамере «Binder» 27°C.

**ДНК-баркодирование.** Растительный материал хранили при температуре -80°C до выделения ДНК. Эк-

тракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода СТАВ [32] с нашей модификацией. Извлеченную ДНК проверяли на качество с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле при 120В в течение 30 минут. ДНК хранили в морозильной камере (-20°C) до использования на следующем этапе эксперимента. Выбор универсальных праймеров для ДНК-баркодов основывался на соответствующей литературе, подробная информация о которой представлена в Таблице 2, синтезированные Лабораторией органического синтеза Национального центра биотехнологии (НЦБ) (Астана, Казахстан). Эксперименты по амплификации и секвенированию проведены в Лаборатории генной инженерии растений Национального Центра Биотехнологии в соответствии со стандартным протоколом данной лаборатории [33].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В связи с тем, что семена *Fraxinus sogdiana* обладают долгим эндогенным покоем было необходимо ускоренное выведение семян из этого состояния для того, чтобы ввести в культуру *in vitro*. Из данных Таблицы 3 следует, что на контрольных вариантах, т. е. без яровизации выход стерильной культуры при комнатной температуре составил 30%, в то время как при холодной обработке этот показатель составил 60%, то есть в два раза выше. По-

Таблица 3. Определение жизнеспособности семян *Fraxinus sogdiana* при яровизации (дистиллированная вода)

Варианты эксперимента	Количество семян, шт.	Контаминация, %	Жизнеспособность семян, %
Комнатная температура	10	70 ±1,08	30 ±2,67
Холодовая обработка (+4°C) + снег	10	40 ±0,65	60 ±1,09

Таблица 4. Выход стерильной культуры в зависимости от экспозиции и концентрации гипохлорита натрия

Гипохлорит натрия, %	Среда	Количество семян, шт.	Контаминирование культуры, %
10	MS без гормонов	5	20 ±0,85
20	MS без гормонов	5	20 ±0,56
30	MS без гормонов	5	0 ±0,15
10	MS+6-БАП 2 мг/л+кинетин 2 мг/л	5	60 ±1,11
20	MS+6-БАП 2 мг/л+кинетин 2 мг/л	5	20 ±0,12
30	MS+6-БАП 2 мг/л+кинетин 2 мг/л	5	0 ±0,01

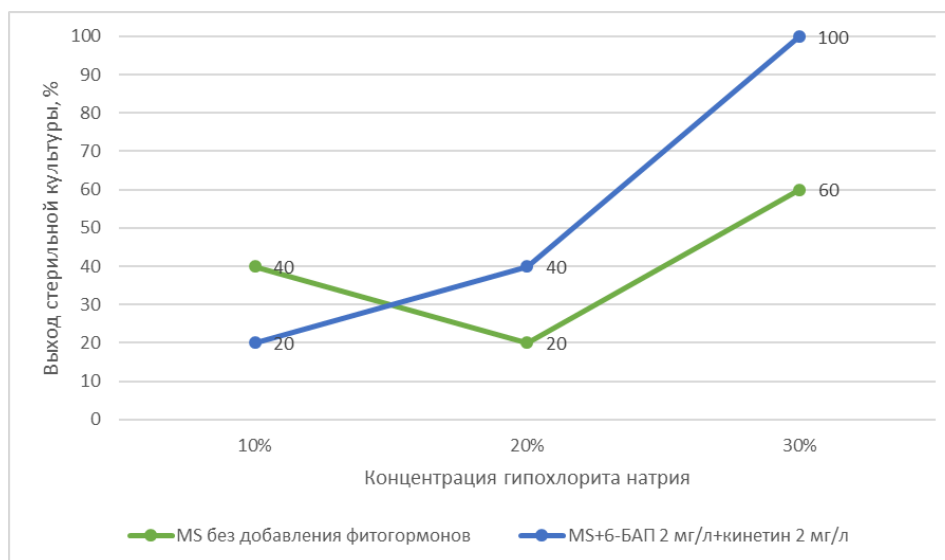


Рисунок 1. Выход стерильной культуры в зависимости от концентрации гипохлорита натрия

Таблица 5. Образование стерильных побегов в зависимости от времени экспозиции

Гипохлорит натрия, 30%				
Время экспозиции	Среда	Количество семян, шт.	Контаминирование культуры, %	Выход стерильной культуры
3 минуты	MS без гормонов	15	27±1,78	27±1,24
5 минут	MS без гормонов	15	13±0,69	53±1,95

казатели контаминации в условиях холодной обработки ниже в 1,75 раза в сравнении с комнатной температурой. Возможно, это связано с замедлением роста микроорганизмов.

Важным этапом в введении в культуру *in vitro* является соблюдение асептических условий, как об этом было сказано выше. В Таблице 4 показаны результаты по жизнеспособности семян *Fraxinus sogdiana*.

Исходя из данных Таблицы 4, высокий показатель по выходу стерильной культуры отмечен при обработке семян 30% гипохлоритом натрия, где контаминация отсутствовала. При обработке 20% гипохлоритом натрия контаминирование культуры составляет 20%, а при обработке 10% гипохлоритом натрия, отмечен высокий уровень контаминации, где этот показатель составил 60%.

По результатам Рисунка 1 наибольший 100% асептический выход культуры получен после обработки семян 30% гипохлоритом натрия. Наименьшие значения были получены после обработки семян 10- и 20% гипохлоритом натрия, выходы асептической культуры был равен 20% и 40% соответственно.

Влияние времени экспозиции на получение асептических проростков можно увидеть в Таблице 5.

По результатам Таблицы 5 у семян, обработанных 30% раствором гипохлорита натрия в течение 3 минут, получена 27%-ная асептическая культура, а после 5-минутной обработки этот показатель был вдвое больше, т.е. 53%. По данным Таблицы 4 и 5, рекомендуемый режим стерилизации для *Fraxinus sogdiana* является 30% гипохлоритом натрия, экспозиция 5 минут, и первоначальная обработка



Рисунок 2. Стерильная культура *Fraxinus sogdiana* на 3 неделе культивирования: А – комнатная температура; Б – холодная обработка

Таблица 6. Побегообразование *Fraxinus sogdiana* на разных пассажах культивирования

Семена <i>Fraxinus sogdiana</i>	Варианты питательных сред	Из асептических побегов		
		I пассаж	II пассаж	III пассаж
Семена без поранения	DKW без гормонов	7±0,54	11±1,04	18±0,99
	DKW+6-БАП 2 мг/л +кинетин 2 мг/л	3±0,31	8±0,78	13±1,15
	MS без гормонов	5±0,87	13±2,1	22±1,74
	MS+6-БАП 2 мг/л +кинетин 2 мг/л	3±0,34	7±1,23	15±1,33
Семена с поранениями	MS без гормонов	13±1,24	22±1,54	39±1,88
	MS+6-БАП 2 мг/л +кинетин 2 мг/л	8±0,87	15±1,02	31±2,04

перманганатом калия.

На рис. 2 показан рост культуры *Fraxinus sogdiana* перед черенкованием, полученные при яровизации семян, а также в контрольных условиях.

В следующей серии экспериментов выявлено, что предварительное поранение семян перед введением в питательные среды является более эффективным, чем введение семян без поранений. В таблице 6 приведены данные по образованию побегов из асептической культуры ясеня по периодам пассирования.

Данные Таблицы 6 демонстрируют, что на III пассаже из семян без поранений на среде MS без добавления гормонов получено 22 микропобега, в то время как из пораненных семян, получено 39 микропобегов, что выше на 1,77 раза. Самые низкие показатели получены из семян без поранений. Также данные Таблицы 6 демонстрируют, что особой разницы среды MS и DKW не выявлено. На среде DKW с добавлением гормонов отмечено 13 микропобегов, а на среде MS с добавлением гормонов 15 микропобегов. По результатам пассирования культуры *Fraxinus sogdiana* можно отметить, что с каждым пассажем количество микропобегов увеличивается. Кроме того, необходимо отметить, что на среде MS без гормонов количество дополнительных побегов выше чем на остальных вариантах и составляет 39 побегов.

На разных этапах культивирования на среде MS без добавления фитогормонов, образовались микропобеги, показанные на рис. 3.

С целью изучения факторов, влияющих на образование дополнительных побегов *Fraxinus sogdiana*, определяли образование асептических побегов, полученных в разные сезоны года, результаты представлены на рис. 4.

Согласно результатам рис. 4, существенной разницы между сезонами не замечено, что может быть связано с тем, что исследования проведены на семенах. Самый высокий результат получен от семян, внесенных в условия *in vitro* весной. Выход асептических побегов составил 88% на среде MS без гормонов и 61% на среде с добавлением гормонов. Самый низкий показатель был осенью – 75% и 63% соответственно.

**ДНК-баркодирование.** Последовательности гена

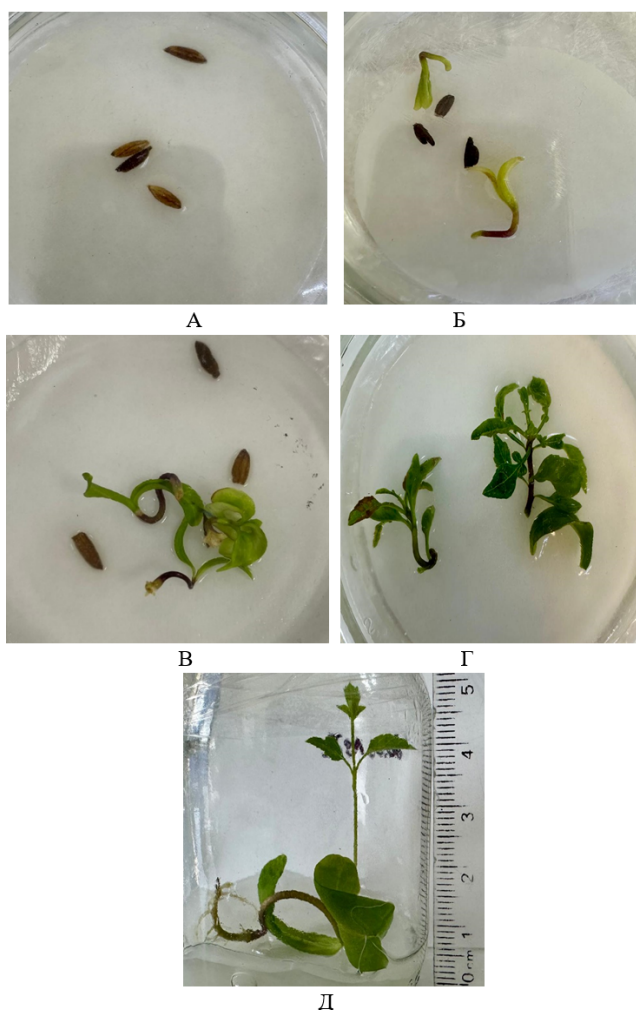


Рисунок 3. Этапы МКР *Fraxinus sogdiana*: А – стерильные семена; Б – одиночные асептические побеги; В – побеги перед пассированием; Г – после II пассажа; Д – IV пассаж.

*matK* (PP836055), гена *rbcl* (PP836056) и ITS (PP830058) у *F. sogdiana* доступны в базе данных NCBI.

В данном исследовании использованы нуклеотидные последовательности растения *F. sogdiana*, а также 26 последовательностей гена *matK*, 39 последовательностей гена *rbcl* и 20 последовательностей региона ITS видов *Fraxinus* из базы данных NCBI, для определения филогене-

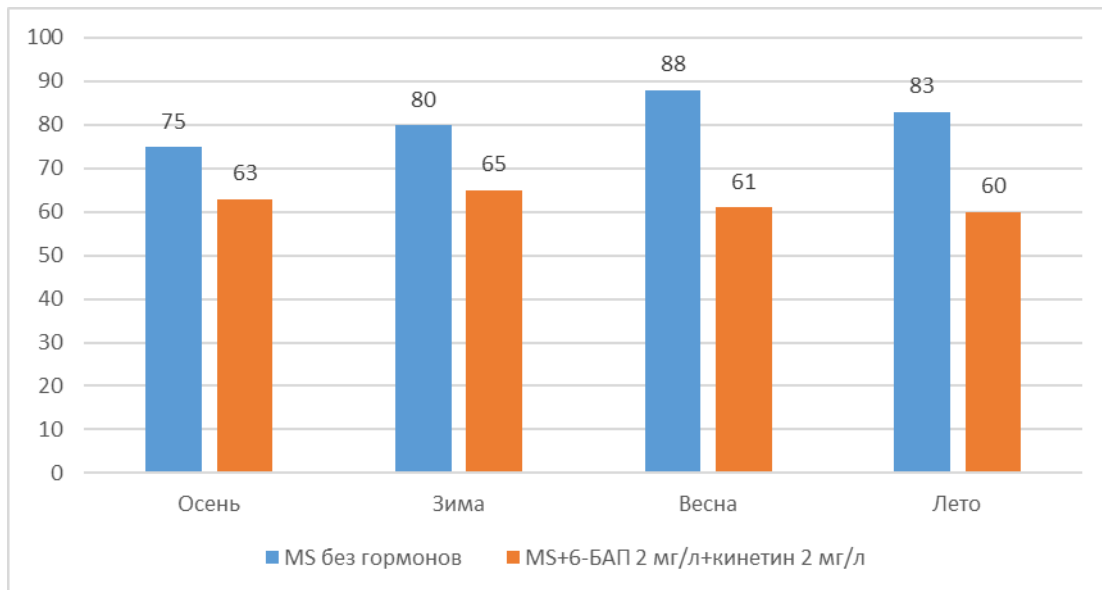


Рисунок 4. Развитие асептических побегов в зависимости от периода введения семян в культуру *in vitro* роста растений

\*Примечание: доверительный интервал: 75±0,98; 63±1,54; 80±1,41; 65±1,02; 88±1,68; 61±0,56; 83±0,74; 60±0,47.

нетических взаимоотношений. Длина последовательностей составила 712 п.н. для гена *matK*, 513 п.н. для гена *rbcL* и 469 п.н. для области ITS. Количество мономорфных сайтов варьировало между 15-697 п.н., а полиморфных сайтов между 4-376 п.н.

Генетическая изменчивость последовательностей проанализирована с помощью двух тестов на нейтральность, таких как нуклеотидная изменчивость ( $P_i$ ) и тест на нейтральность Тадзимы ( $\pi$ ). Значение  $P_i$  варьировалось от 0,00182 для гена *rbcL* до 0,305 для ITS, в то время как  $\pi$  варьировалось от 0,00182 для гена *rbcL* до 0,295 для ITS (таблица 7).

В ходе филогенетического анализа виды *Fraxinus* раз-

делены на две или три основные группы на основе всех использованных маркеров баркодирования (рис. 5). Анализ структуры генов *matK* показал, что 19 последовательностей образуют группу 1 (G1) со средними попарными расстояниями 0,00. Группа 2 (G2) состояла из четырех видов со средними попарными расстояниями 0,00. Группа 3 (G3) включала три вида со средними попарными расстояниями, равными 0,00. Среднее попарное расстояние между G1 и G2 составило 0,00518, между G1 и G3 - 0,00293, а между G2 и G3 - 0,00284.

Ген *rbcL* показал, что виды *Fraxinus* разделены на три группы, включая G1, в которую входил 21 вид, G2, в которую входили два вида, и G3, в которую входили 8 видов со

Таблица 7. Генетическая изменчивость *F. sogleiana*, основанная на последовательностях баркодирования

	Ген <i>matK</i>	Ген <i>rbcL</i>	Область ITS
Общая длина выравнивания (п.н.)	712	513	469
Содержание GC (%)	34	43.6	63.8
Количество кодонов	236	171	0
Количество мономорфных сайтов	697	509	15
Количество полиморфных сайтов	6	4	376
Общее количество вставок и делеций	9	0	17
Количество единичных переменных сайтов	2	0	10
Общее количество мутации	6	4	628
Парсимонно информативные сайты (PIC)	4	4	366
Нуклеотидная изменчивость ( $P_i$ )	0.00222	0.00182	0.305
Тест на нейтральность Тадзимы ( $\pi$ )	0,01659	0,00182	0.295
Значение нуклеотидного различия (k)	1,561	0,934	119.413
Количество гаплотипов (h)	6	5	20
Разнообразие гаплотипов (Hd)	0.769	0,563	0.982
Дисперсия разнообразия гаплотипов	0.00220	0,00604	0.00034
Консервативность последовательности (C)	0.989	0,992	0.047
Порог консервативности (CT)	1	1	0,14

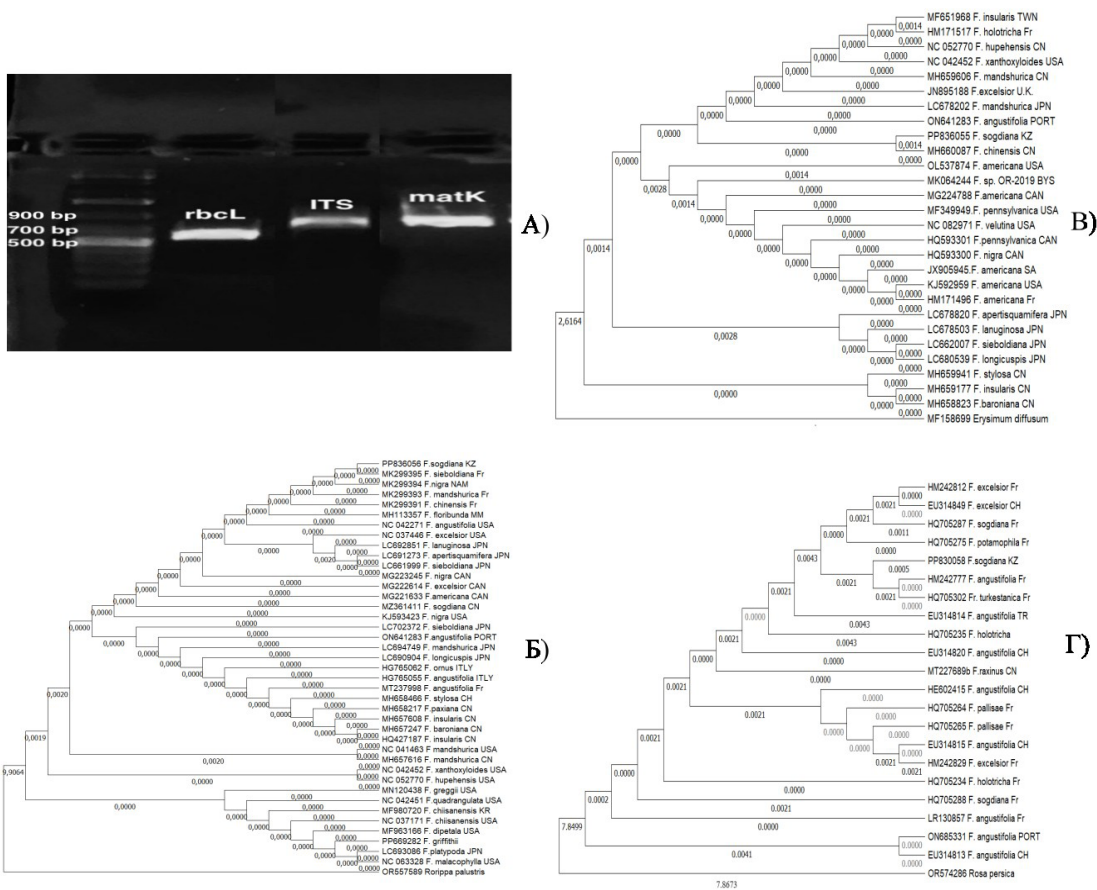


Рисунок 5. Филогенетическое древо *Fraxinus sogdiana*, основанное на методе максимального правдоподобия (ML) и двухпараметрической модели Кимуры (K2P). А) Результат ПЦР, Б) ген *rbcL*, В) ген *matK*, Г) область ITS.

средними попарными расстояниями 0,00. Среднее попарное расстояние между G1 и G2 составило 0,00222, между G1 и G3 - 0,00418, а между G2 и G3 - 0,00195.

Область ITS показала, что виды *Fraxinus* были разделены на две группы, включая G1, в которую входили 18 видов со средними попарными расстояниями 14,36, и G2, в которую входили два вида со средними попарными расстояниями 0,00. Среднее попарное расстояние между G1 и G2 составило 5,28.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что МКР является действенным инструментом селекционных программ по редким и исчезающим растениям, а также по размножению коммерческих культур. Например, в исследованиях V. Lebedev и K. Shestibratov (2016) у растения *Fraxinus excelsior* L. достигнут коэффициент размножения 7.6 при использовании одноузловых эксплантов на среде MS с 1 и 2 мг/л 6-БАП. Побеги всех типов эксплантов были значительно выше на среде с 2 мг/л 6-БАП. Эффективность формирования пазушных побегов была максимальной в дистальных узлах и снижалась к проксимальным узлам эксплантов [37]. В наших исследованиях, наибольший коэффициент размножения также был получен на среде MS без добавления фитогормонов. Возможно, использованный нами вид *Fraxinus sogdiana*, обладает наибольшим содержанием эндогенных фитогормонов, и поэтому их можно размножать без добавления фитогормонов. Коэффициент размноже-

ния на III пассаже достиг 3:39 микропобегов.

Исследователи Ningxia Du и Paula M. Pijut культивировали *Fraxinus pennsylvanica*, где в среду MS добавляли 13,3  $\mu\text{M}$  6-БАП+4,5  $\mu\text{M}$  тидиазурина (TDZ) и 22,2  $\mu\text{M}$  6-БАП+4,5  $\mu\text{M}$  TDZ соответственно. 76% сегментов гипокотилей и 24% сегментов семядолей дали адвентивные побеги, при этом среднее количество адвентивных побегов на эксплант составило  $2,7 \pm 0,5$  и  $2,3 \pm 1,3$  [38]. В наших экспериментах не было возможности проверить влияние тидиазурина, поэтому эксперименты проведены при добавлении 6-БАП в сочетании с кинетином. Таким образом, заключая экспериментальные данные можно сказать, что вид *Fraxinus sogdiana* отличается тем, что можно получать дополнительные побеги на безгормональной среде.

Молекулярные маркеры, использованные в этом исследовании, оказались полезными для определения основных филогенетических линий *Fraxinus*. Исследования Arca et al. (2012) показало, что виды *Fraxinus* дифференцированы по под родам и секциям. В наших исследованиях хлоропластный маркер *matK* предоставил существенную информацию для понимания филогении *Fraxinus*, а молекулярные структуры убедительно подтвердили, что виды *Fraxinus* дифференцированы по под родам и секциям. Например, результаты анализа гена *matK* показали, что виды из секций *Sciadanthus*, *Fraxinus* и *Melioides* отнесены к группе 1, в то время как виды из секции *ognus* принадлежат к группам 2 и 3. Другой интересный результат заключается в том, что виды *ognus* из групп 2 и 3 также разли-

чались по странам. Вид *ornus* во 2-й группе из Японии, а вид *ornus* в 3-й группе - из Китая. При сравнительном анализе с использованием среднего попарного расстояния у *F. Sogdiana* были те же закономерности, что и у *F. chinensis*, *F. mandshurica*, *F. hupehensis*, *F. angustifolia*, *F. mandshurica* и *F. excelsior*; *F. xanthoxyloides*, *F. floribunda*, *F. nigra*, *F. sieboldiana*, *F. ornus*, *F. paxiana*, *F. insularis*, *F. baroniana*, *F. turkestanica*, *F. obliqua* и *F. Potamophila* [39].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определен рекомендуемый метод стерилизации семян *Fraxinus sogdiana* – первичная обработка перманганатом калия в течение 5 мин и 30% гипохлоритом натрия.

Установлено, что из семян *Fraxinus sogdiana* побеги формируются быстрее при повреждении. На III пассаже на среде MS без гормонов было получено 22 микропобега из неповрежденных семян и 39 микропобегов из поврежденных семян.

При изучении влияния сезонности на формирование дополнительных побегов *Fraxinus sogdiana* наиболее высокие показатели получены для введенных в культуру эксплантов 88% весной и 83% летом, а осенью получено 75%, что можно объяснить физиологическими процессами клеточного метаболизма на каждом из этапов. Например, весной семена быстро просыпаются от эндогенного покоя, а осенью, наоборот, эндогенный покой длится продолжительное время.

Выявлено, что последовательности гена *matK* лучше всего подходят для того, чтобы отличать *F. sogdiana* от других видов на генетическом уровне. Данные исследования содержат и фундаментальную информацию, и может быть полезна для анализа и идентификации видов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aldibekova A., Kurmanbayeva M., Aksoy A., Permitina V., Dimeyeva L., Zverev N. Anatomical structure and phytochemical composition of a rare species *Fraxinus sogdiana* Bunge (Oleaceae) growing in different soils in Kazakhstan // *Diversity*. – 2023. – Vol. 15, № 6. – P. 769.
2. Barstow M., Oldfield S., Westwood M., Jerome D., Beech E., Rivers M. The red list of *Fraxinus*. – 2018.
3. Kim C., Kim D.-K., Sun H., Kim J.-H. Phylogenetic relationship, biogeography, and conservation genetics of endangered *Fraxinus chiisanensis* (Oleaceae), endemic to South Korea // *Plant Diversity*. – 2022. – Vol. 44, № 2. – P. 170-180.
4. Wallander E. Systematics and floral evolution in *Fraxinus* (Oleaceae) // *Belgische Dendrologie Belge*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 39-58.
5. Hinsinger D. D., Basak J., Gaudeul M., Cruaud C., Bertolino P., Frascaria-Lacoste N., Bousquet J. The phylogeny and biogeographic history of ashes (*Fraxinus*, Oleaceae) highlight the roles of migration and vicariance in the diversification of temperate trees // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. e80431.
6. Красная книга Казахстана. Растения // Astana: Art Print. – 2014. – Vol. 21. – P. 452.
7. Jallali I., Hédi A., Nour R., Hannachi H., Essghaier B. Green synthesis of silver nanoparticles from *Fraxinus angustifolia* Vahl. Extract: Characterization and assessment of their biological activities // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2024. – Vol. 57. – P. 103086.
8. Bouguellid G., Russo C., Lavorgna M., Piscitelli C., Ayouni K., Wilson E., Kim H. K., Verpoorte R., Choi Y. H., Kilani-Atmani D. Antimutagenic, antigenotoxic and antiproliferative activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl. leaves and stem bark extracts and their phytochemical composition // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15, № 4. – P. e0230690.
9. Fenning T., O'donnell M., Preedy K., Bézanger A., Kenyon D., Lopez G. The rooting ability of in vitro shoot cultures established from a UK collection of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their ex vitro survival // *Annals of Forest Science*. – 2022. – Vol. 79, № 1. – P. 30.
10. Hebda A., Liszka A., Zgłobicki P., Nawrot-Chorabik K., Lyczakowski J. J. Transformation of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) callus as a starting point for understanding the molecular basis of ash dieback // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 2524.
11. Kostova I., Iossifova T. Chemical components of *Fraxinus* species // *Fitoterapia*. – 2007. – Vol. 78, № 2. – P. 85-106.
12. He L., Xu Y., Zeng F., Tian H., Xiao Y., Liu H., Yu L., Zhan Y. Establishment of a micropropagation supporting technology for the *Fraxinus mandshurica* × *Fraxinus sogdiana* // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. – 2021. – Vol. 57. – P. 307-318.
13. Islami Rostami H. R., Hosseini Nasr S. M., Kazemtabar S. K., Zafarian F. Effect of provenances and culture media on seed germination of ash (*Fraxinus excelsior* L.) in embryo in vitro culture // *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*. – 2019. – Vol. 27, № 2. – P. 159-168.
14. Shukla S., Shukla S. K. Micropropagation for crop improvement and its commercialization potential // *The Potential of Microbes for a Circular Economy Elsevier*, 2024. – P. 271-287.
15. Sambeek J. V., Preece J. In vitro propagation of *Fraxinus* species // *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* Springer, 2007. – P. 179-192.
16. Dancheva D., Iliev I. Factors affecting adventitious shoot formation in *Fraxinus excelsior* L // *Propag Ornament Plants*. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 10-20.
17. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 2761-2762.
18. Gill B. A., Musili P. M., Kurukura S., Hassan A. A., Goheen J. R., Kress W. J., Kuzmina M., Pringle R. M., Kartzinel T. R. Plant DNA-barcode library and community phylogeny for a semi-arid East African savanna // *Molecular Ecology Resources*. – 2019. – Vol. 19, № 4. – P. 838-846.
19. Li H., Xiao W., Tong T., Li Y., Zhang M., Lin X., Zou X., Wu Q., Guo X. The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1424.
20. Xu S. Z., Li Z. Y., Jin X. H. DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants // *Molecular ecology resources*. – 2018. – Vol. 18, №



1. – P. 128-136.

21. Vasconcelos S., Nunes G. L., Dias M. C., Lorena J., Oliveira R. R., Lima T. G., Pires E. S., Valadares R. B., Alves R., Watanabe M. T. Unraveling the plant diversity of the Amazonian canga through DNA barcoding // *Ecology and Evolution*. – 2021. – Vol. 11, № 19. – P. 13348-13362.

22. Jones L., Twyford A. D., Ford C. R., Rich T. C., Davies H., Forrest L. L., Hart M. L., McHaffie H., Brown M. R., Hollingsworth P. M. Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom // *Molecular Ecology Resources*. – 2021. – Vol. 21, № 6. – P. 2050-2062.

23. Wallander E. Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy // *Plant Systematics and Evolution*. – 2008. – Vol. 273, № 1. – P. 25-49.

24. Jeandroz S., Roy A., Bousquet J. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus Fraxinus (Oleaceae) based on Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1997. – Vol. 7, № 2. – P. 241-251.

25. Yi X., Li M., Chen L., Wang X. The complete chloroplast genome of Fraxinus pennsylvanica (Oleaceae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2019. – Vol. 4, № 1. – P. 1932-1933.

26. Kim C., Kim H.-J., Do H. D. K., Jung J., Kim J.-H. Characterization of the complete chloroplast genome of Fraxinus chiisanensis (Oleaceae), an endemic to Korea // *Conservation Genetics Resources*. – 2019. – Vol. 11. – P. 63-66.

27. Duan H.-C., Zheng X.-H., Li Y.-Y., Li S.-M., Ye L., Jing H.-Z., Dong Q. The complete chloroplast genome of Fraxinus malacophylla (Oleaceae, Oleoideae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2020. – Vol. 5, № 3. – P. 3570-3571.

28. Olofsson J. K., Cantera I., Van de Paer C., Hong-Wa C., Zedane L., Dunning L. T., Alberti A., Christin P. A., Besnard G. Phylogenomics using low-depth whole genome sequencing: A case study with the olive tribe // *Molecular ecology resources*. – 2019. – Vol. 19, № 4. – P. 877-892.

29. Bagramova A.N., Rakhimzhanova A.O., Manabayeva S.A. Features of microclonal propagation and organogenesis of Sogdian Ash in vitro culture // *Prospects and key tendencies of science in contemporary world*. – 2023. – P. 7-16.

30. Karimah K., Yuniati R., Handayani W. In vitro culture from internodes of Melastoma malabathricum L. on Murashige and Skoog (1962) modified medium with thidiazuron and 1-naphthaleneacetic acid // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, – Vol. 481. – 2020. – P. 012007.

31. Driver J. A., Kuniyuki A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock // *HortScience*. – 1984. – Vol. 19, № 4. – P. 507-509.

32. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical bulletin*. – 1987.

33. Sutula M., Kakanay A., Tussipkan D., Dzhumanov S., Manabayeva S. Phylogenetic Analysis of Rare and Endangered Tulipa Species (Liliaceae) of Kazakhstan Based on Universal Barcoding Markers // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, № 6. – P. 365.

34. Zhang C.Y., Wang F.Y., Yan H.F., Hao G., Hu C.M., Ge X.J. Testing DNA barcoding in closely related groups of Lysimachia L. (Myrsinaceae) // *Molecular Ecology Resources*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 98-108.

35. Kuzmina M. L., Johnson K. L., Barron H. R., Hebert P. D. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library // *BMC ecology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1-11.

36. Khan A. M., Bhadauria S. Molecular characterization of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers // *Journal of King Saud University-Science*. – 2019. – Vol. 31, № 4. – P. 1418-1423.

37. Lebedev V., Shestibratov K. Large-scale micropropagation of common ash // *Biotechnology*. – 2016. – Vol. 15, № 1/2. – P. 1-9.

38. Du N., Pijut P. M. Regeneration of plants from Fraxinus pennsylvanica hypocotyls and cotyledons // *Scientia horticulturae*. – 2008. – Vol. 118, № 1. – P. 74-79.

39. Arca M., Hingsinger D. D., Cruaud C., Tillier A., Bousquet J., Frascaria-Lacoste N. Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar Fraxinus // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. e34089.

## REFERENCES

1. Aldibekova A., Kurmanbayeva M., Aksoy A., Permitina V., Dimeyeva L., Zverev N. Anatomical structure and phytochemical composition of a rare species Fraxinus sogdiana Bunge (Oleaceae) growing in different soils in Kazakhstan // *Diversity*. – 2023. – Vol. 15, № 6. – P. 769.

2. Barstow M., Oldfield S., Westwood M., Jerome D., Beech E., Rivers M. The red list of Fraxinus. – 2018.

3. Kim C., Kim D.-K., Sun H., Kim J.-H. Phylogenetic relationship, biogeography, and conservation genetics of endangered Fraxinus chiisanensis (Oleaceae), endemic to South Korea // *Plant Diversity*. – 2022. – Vol. 44, № 2. – P. 170-180.

4. Wallander E. Systematics and floral evolution in Fraxinus (Oleaceae) // *Belgische Dendrologie Belge*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 39-58.

5. Hingsinger D. D., Basak J., Gaudeul M., Cruaud C., Bertolino P., Frascaria-Lacoste N., Bousquet J. The phylogeny and biogeographic history of ashes (Fraxinus, Oleaceae) highlight the roles of migration and vicariance in the diversification of temperate trees // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. e80431.

6. Krasnaja kniga Kazahstana. Rastenija // *Astana: Art Print*. – 2014. – Vol. 21. – P. 452.

7. Jallali I., Hédi A., Nour R., Hannachi H., Essghaier B. Green synthesis of silver nanoparticles from Fraxinus angustifolia Vahl. Extract: Characterization and assessment of their biological activities // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2024. – Vol. 57. – P. 103086.

8. Bouguellid G., Russo C., Lavorgna M., Piscitelli C., Ayouni K., Wilson E., Kim H. K., Verpoorte R., Choi Y. H., Kilani-Atmani D. Antimutagenic, antigenotoxic and antiproliferative activities of Fraxinus angustifolia Vahl. leaves and stem bark extracts and their phytochemical composition // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15, № 4. – P. e0230690.

9. Fenning T., O'donnell M., Preedy K., Bézanger A., Kenyon D., Lopez G. The rooting ability of in vitro shoot cultures established from a UK collection of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their ex vitro survival // *Annals of Forest Science*. – 2022. – Vol. 79, № 1. – P. 30.
10. Hebda A., Liszka A., Zgłobicki P., Nawrot-Chorabik K., Lyczakowski J. J. Transformation of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) callus as a starting point for understanding the molecular basis of ash dieback // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 2524.
11. Kostova I., Iossifova T. Chemical components of *Fraxinus* species // *Fitoterapia*. – 2007. – Vol. 78, № 2. – P. 85-106.
12. He L., Xu Y., Zeng F., Tian H., Xiao Y., Liu H., Yu L., Zhan Y. Establishment of a micropropagation supporting technology for the *Fraxinus mandshurica* × *Fraxinus sogdiana* // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. – 2021. – Vol. 57. – P. 307-318.
13. Islami Rostami H. R., Hosseini Nasr S. M., Kazemitarab S. K., Zafarian F. Effect of provenances and culture media on seed germination of ash (*Fraxinus excelsior* L.) in embryo in vitro culture // *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*. – 2019. – Vol. 27, № 2. – P. 159-168.
14. Shukla S., Shukla S. K. Micropropagation for crop improvement and its commercialization potential // *The Potential of Microbes for a Circular Economy Elsevier*, 2024. – P. 271-287.
15. Sambeek J. V., Preece J. In vitro propagation of *Fraxinus* species // *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits Springer*, 2007. – P. 179-192.
16. Dancheva D., Iliev I. Factors affecting adventitious shoot formation in *Fraxinus excelsior* L // *Propag Ornament Plants*. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 10-20.
17. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 2761-2762.
18. Gill B. A., Musili P. M., Kurukura S., Hassan A. A., Goheen J. R., Kress W. J., Kuzmina M., Pringle R. M., Kartzinel T. R. Plant DNA-barcode library and community phylogeny for a semi-arid East African savanna // *Molecular Ecology Resources*. – 2019. – Vol. 19, № 4. – P. 838-846.
19. Li H., Xiao W., Tong T., Li Y., Zhang M., Lin X., Zou X., Wu Q., Guo X. The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1424.
20. Xu S. Z., Li Z. Y., Jin X. H. DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants // *Molecular ecology resources*. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 128-136.
21. Vasconcelos S., Nunes G. L., Dias M. C., Lorena J., Oliveira R. R., Lima T. G., Pires E. S., Valadares R. B., Alves R., Watanabe M. T. Unraveling the plant diversity of the Amazonian canga through DNA barcoding // *Ecology and Evolution*. – 2021. – Vol. 11, № 19. – P. 13348-13362.
22. Jones L., Twyford A. D., Ford C. R., Rich T. C., Davies H., Forrest L. L., Hart M. L., McHaffie H., Brown M. R., Hollingsworth P. M. Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom // *Molecular Ecology Resources*. – 2021. – Vol. 21, № 6. – P. 2050-2062.
23. Wallander E. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy // *Plant Systematics and Evolution*. – 2008. – Vol. 273, № 1. – P. 25-49.
24. Jeandroz S., Roy A., Bousquet J. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1997. – Vol. 7, № 2. – P. 241-251.
25. Yi X., Li M., Chen L., Wang X. The complete chloroplast genome of *Fraxinus pennsylvanica* (Oleaceae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2019. – Vol. 4, № 1. – P. 1932-1933.
26. Kim C., Kim H.-J., Do H. D. K., Jung J., Kim J.-H. Characterization of the complete chloroplast genome of *Fraxinus chiisanensis* (Oleaceae), an endemic to Korea // *Conservation Genetics Resources*. – 2019. – Vol. 11. – P. 63-66.
27. Duan H.-C., Zheng X.-H., Li Y.-Y., Li S.-M., Ye L., Jing H.-Z., Dong Q. The complete chloroplast genome of *Fraxinus malacophylla* (Oleaceae, Oleoideae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2020. – Vol. 5, № 3. – P. 3570-3571.
28. Olofsson J. K., Cantera I., Van de Paer C., Hong-Wa C., Zedane L., Dunning L. T., Alberti A., Christin P. A., Besnard G. Phylogenomics using low-depth whole genome sequencing: A case study with the olive tribe // *Molecular ecology resources*. – 2019. – Vol. 19, № 4. – P. 877-892.
29. Bagramova A.N., Rakhimzhanova A.O., Manabayeva S.A. Features of microclonal propagation and organogenesis of Sogdian Ash in vitro culture // *Prospects and key tendencies of science in contemporary world*. – 2023. – P. 7-16.
30. Karimah K., Yuniati R., Handayani W. In vitro culture from internodes of *Melastoma malabathricum* L. on Murashige and Skoog (1962) modified medium with thidiazuron and 1-naphthalenacetic acid // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing. – Vol. 481 – 2020. – P. 012007.
31. Driver J. A., Kuniyuki A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock // *HortScience*. – 1984. – Vol. 19, № 4. – P. 507-509.
32. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical bulletin*. – 1987.
33. Sutula M., Kakanay A., Tussipkan D., Dzhumanov S., Manabayeva S. Phylogenetic Analysis of Rare and Endangered Tulipa Species (Liliaceae) of Kazakhstan Based on Universal Barcoding Markers // *Biology*. – 2024. – Vol. 13, № 6. – P. 365.
34. Zhang C.Y., Wang F.Y., Yan H.F., Hao G., Hu C.M., Ge X.J. Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (Myrsinaceae) // *Molecular Ecology Resources*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 98-108.
35. Kuzmina M. L., Johnson K. L., Barron H. R., Hebert P. D. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library // *BMC ecology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1-11.
36. Khan A. M., Bhadauria S. Molecular characteriza-

tion of keratin degrading fungi isolated from semi-arid soil by PCR using ITS4 and ITS5 primers // Journal of King Saud University-Science. – 2019. – Vol. 31, № 4. – P. 1418-1423.

37. Lebedev V., Shestibratov K. Large-scale micropropagation of common ash // Biotechnology. – 2016. – Vol. 15, № 1/2. – P. 1–9.

38. Du N., Pijut P. M. Regeneration of plants from *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and cotyledons // Scientia horticulturae. – 2008. – Vol. 118, № 1. – P. 74-79.

39. Arca M., Hinsinger D. D., Cruaud C., Tillier A., Bousquet J., Frascaria-Lacoste N. Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar *Fraxinus* // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. e34089.

ӨОК: 57.085.2

**FRAXINUS SOGDIANA-НЫҢ IN VITRO ӘДІСІ АРҚЫЛЫ ТЕЗ АРАДА КӨБЕЙТУ МҮМКІНДІКТЕРІ ЖӘНЕ ДНҚ БАРКОДТАУ АРҚЫЛЫ РЕЛИКТИ АҒАШЫН АНЫҚТАУ**Амангельдинова М.К.<sup>1\*</sup>, Беккужина С.С.<sup>1,2</sup>, Жұмабай Н.Б.<sup>1,2</sup>, Түсіпқан Д.<sup>2</sup>, Манабаева Ш.А.<sup>2</sup><sup>1</sup> С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, 010011, Қазақстан, Астана, Жеңіс даңғылы, 62,<sup>2</sup> Ұлттық биотехнология орталығы 010000, Қазақстан, Астана, Қорғалжын тас жолы, 13/5

\* Корреспондент автор: madina.27.09@mail.ru

**АБСТРАКТ**

Қазақстанда *Fraxinus*-тың төрт түрі өседі: *F. angustifolia* subsp. *syriaca* (Boiss.) Yalt., *F. sogdiana* Bunge, *F. pennsylvanica* Marshall и *F. americana* L. Бұл зерттеу жұмысында *in vitro* *Fraxinus sogdiana* жағдайында эндогендік тыныштықтан ояту мүмкіншіліктері анықталған. Бақылау нұсқаларында, яғни яровизациясыз бөлме температурасында стерильді өркендердің шығымы 30% құрады, ал суық өңдеу кезінде бұл көрсеткіш 60%-ке жоғарылады. Гормондарды қоспай, MS қоректік ортасында зақымданбаған тұқымдардан микроклональды көбею арқылы 22, ал зақымданған тұқымдардан 39 микроөркендер алынды. Филогенетикалық қатынастар мен түрлерді сәйкестендіру үш ДНҚ маркері арқылы талданды, *F. sogdiana*-ны NCBI дерекқорындағы түрлермен салыстырылды. ДНҚ баркодтары *rbcL*, ITS *Fraxinus* түрлері арасында қанағаттанарлық тұраралық генетикалық вариацияны көрсетпеді. Атап айтсақ, *matK* генінің тізбегі *F. sogdiana*-ны басқа түрлерден тиімді ажыратады және нәтижелер түрлерді анықтау үшін биотехнологиялық және молекулалық зерттеулер үшін пайдалы болуы мүмкін.

**Түйін сөздер:** *Fraxinus sogdiana*, *in vitro*, микроклональды көбею, ДНҚ-баркодтау, *rbcL*, ITS

UDC: 57.085.2

**POTENTIAL FOR ACCELERATED REPLICATION OF FRAXINUS SOGDIANA USING IN VITRO CULTURE AND IDENTIFICATION OF A RELIC TREE USING DNA-BARCODING**Amangeldinova M.K.<sup>1\*</sup>, Bekkuzhina S.S.<sup>1,2</sup>, Zhumabay N.B.<sup>1,2</sup>, Tusipkan D.<sup>2</sup>, Manabayeva S.A.<sup>2</sup><sup>1</sup> Kazakh Agrotechnical Research University named after S. Seifullin, 010011, Kazakhstan, Astana, Zhenis Ave., 62,<sup>2</sup> National Center of Biotechnology 010000, Kazakhstan, Astana, Kurgaldzhin highway, 13/5

\* Corresponding author: madina.27.09@mail.ru

**ABSTRACT**

Four species of *Fraxinus* including *F. angustifolia* subsp. *syriaca* (Boiss.) Yalt., *F. sogdiana* Bunge, *F. pennsylvanica* Marshall and *F. americana* L. grow in Kazakhstan. The study aimed to determine the conditions for awakening endogenous dormancy *in vitro* of *F. sogdiana*. In the control group without vernalization, the sterile culture yield at room temperature was 30%. However, with cold treatment, this yield increased to 60%, which is twice as high. It was observed that on MS medium without the addition of hormones, 22 microshoots were obtained from unwounded seeds, whereas 39 microshoots were obtained from wounded seeds during microclonal propagation. Phylogenetic relationships and species identification were analyzed using three DNA barcoding markers, comparing *F. sogdiana* with species from the NCBI database. *rbcL* and ITS markers did not show satisfactory interspecific genetic variability among *F.* species. Notably, *matK* gene sequences effectively differentiated *F. sogdiana* from other species. These results provide fundamental information that is valuable for future biotechnological and molecular studies.

**Key words:** *Fraxinus sogdiana*, *in vitro* culture, micropropagation, DNA-barcoding, *rbcL*, ITS