

ЗЕЛЕНИНА Е.А.^{1,2}, МАШКИНА О.С.^{1,2}

¹ Воронежский государственный университет

Россия, 394006, г. Воронеж, ул. Университетская площадь, 1,
e-mail: katy-green2009@yandex.ru

² ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИИ КЛОНОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ (*BETULA PENDULA* Roth var. *carelica* Merkl.) В ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Одним из современных подходов сохранения *ex situ* ценных и уникальных генотипов древесных растений является создание живых коллекций в условиях *in vitro* и их длительное культивирование (долгосрочное хранение). Важным при этом является сохранение генетической и хозяйственной ценности исходных экземпляров. Карельская береза, имеющая большую хозяйственную ценность благодаря декоративной узорчатой текстуре древесины, является сложным объектом для биотехнологических исследований из-за высокого полиморфизма, выявляемого на всех изучаемых уровнях организации: клеточном, хромосомном, тканевом, организменном. В силу ограниченности генетических ресурсов и низкого уровня естественного возобновления карельская береза оказалась в

Материалы и методы

Объектами исследования послужили 5 клонов карельской березы и клон березы повислой из коллекции ФГУП “НИИ лесной генетики и селекции” (г. Воронеж), поддерживаемые в длительной (14-20 лет) культуре. Экспланты взрослых (20-40-летних) деревьев были однократно введены в культуру *in vitro*, из них регенерированы растения, которые затем подвергались многолетнему субкультивированию с интервалом раз в 4-6 месяцев на безгормональной питательной среде по методике [2].

Три исходных дерева были отобраны С.В. Щетинкиным (дерево Ia высокоствольной формы) и Ю.Н. Исаковым (деревья Ш-3 высокоствольной формы и ПК-2 полукустовидной формы) на плантации карельской березы, созданной проф. М.М. Вересиным из семян финского происхождения. Исходное дерево 7319 полукустовидной формы отобрано Ю.Н. Исаковым в потомстве от свободного опыления дерева ПК-2. Данный генотип относится к “трудным” для микрклонального размножения. Жизнеспособный клон Л (мутантный неукореняющийся, формирующий каллусоподобное образование вместо корней) удалось получить только через

последние годы под угрозой исчезновения [1], поэтому сохранение ее ценного генофонда особенно актуально.

Ранее нами был предложен подход [2], уменьшающий вероятность возникновения соматоклональной изменчивости при многолетнем культивировании (полное исключение фитогормонов из состава питательных сред), что может обеспечить генетическую стабильность коллекции и способствовать сохранению ценных признаков исходных генотипов. Коллекция ценных генотипов карельской березы поддерживается нами таким способом свыше 14-20 лет [3].

Целью настоящих исследований явилось изучение цитогенетической стабильности коллекции клонов карельской березы, длительно культивируемой в условиях *in vitro*.

калусные культуры. Триплоидное дерево карельской березы (1/39) отобрано А.В. Козьминым [4] в созданных им культурах из семян карельского происхождения. Часть этих ценных высокоузорчатых деревьев к настоящему времени погибла, поэтому проведение их цитогенетической оценки не представлялось возможным.

В коллекции представлены как нормальные по фенотипу клоны, так и аномальный (клон Л, формирующий каллусоподобное образование вместо корней). Клоны ПК-2, Ш-3 и 1/39 получены через меристемные, а клоны Ia и Л - через стеблевые калусные культуры. Длительность культивирования клона Ia – 20 лет, остальных клонов (ПК-2, Ш-3, Л, 1/39) – 14 лет. Клон местной березы повислой, используемый в качестве контроля, культивируется также на протяжении 14 лет.

Цитогенетическую стабильность оценивали по частоте патологий митоза в корневой меристеме (или каллусе для клона Л) и уровню миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модалного диплоидного набора хромосом). Частота патологий митоза (ПМ) вычислялась как отношение числа клеток

с нарушениями в мета- ана-, телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток (на тех же стадиях), в %. Спектр патологических митозов представлен как процентное от-

ношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов. Учитывали количество клеток с разным числом ядрышек и вычисляли их долю (в %).

Результаты и обсуждения

Показано, что клоны карельской березы из коллекции в длительной культуре (14-20 лет) на питательных средах без гормонов сохраняют свои цитогенетические (таблица) и фенотипиче-

ские особенности: нормальный (клоны Ia, Ш-3, ПК-2, 1/39) или мутантный (клон Л с комплексом измененных признаков) фенотип.

Таблица. Цитогенетическая характеристика клонов карельской березы и березы повислой, длительно культивируемых в условиях *in vitro*

Объект	Длительность культивирования, лет	% клеток с числом хромосом				Уровень миксоплоидии, %
		диплоидных, 2n = 28	триплоидных, 2n = 42	тетраплоидных, 2n = 56	анеуплоидных	
Карельская береза						
Клон Ia	1	74,5	–	–	25,5	25,5±2,6
	14	90,6	–	–	9,4	9,4±0,7* ¹
	20	90,4	–	–	9,6	9,6±1,1*
Клон Ш-3	14	83,0	–	–	17,0	17,0±2,4 ¹
Клон Л	14	64,4	0,2	–	35,4	35,6±3,0
Клон ПК-2	14	7,4	7,4	63,0	22,2	37,0±3,0
Исходное дерево 1/39	0	21,7	60,9	–	17,4	39,1±2,3
Клон 1/39	14	28,6	54,3	–	17,1	45,7±3,1
Береза повислая						
Клон П	14	91,8	–	–	8,2	8,2±1,2 ¹

Примечания: * различия с исходным клоном (1 год культивирования *in vitro*) достоверны при P < 0,01; ¹ различия с клоном Л достоверны при P < 0,01.

Все изученные клоны являются миксоплоидами, что в целом характерно для карельской березы [5]. Уровень миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модалного набора хромосом) зависел от генотипических особенностей клонов, способа их получения и длительности культивирования. Наиболее высокой геномной нестабильностью по числу хромосом отличались полиплоидные клоны 1/39 и ПК-2. Уровень миксоплоидии у них составил соответственно 45,7% и 37,0% (таблица). Тем не менее, клон 1/39 в целом сохранил уровень плоидности и миксоплоидии, присущие исходному дереву. В корневой меристеме микрорастений преобладали клетки с триплоидным набором хромосом (2n=3x=42) – 54,3%. На долю диплоидных клеток (2n=2x=28) приходится 28,6%, а анеуплоидных (гипердиплоидных с 30-34 хромосомами) и гипотриплоидных (с 36-40 хромосомами) – 17,1%. Клон ПК-2 оказался тетраплоидным с преобладанием в корневой меристеме (63,0%) клеток с 56 хромосомами. Остальные клетки приходились на

долю диплоидных (2n=28-7,4%), триплоидных (2n=42-7,4%) и анеуплоидных (22,2%). Возможно, полиплоидной природой анализируемого клона объясняется повышение у него количества ядрышек в интерфазных клетках (1-5 ядрышек против 1-2 – у остальных клонов). Можно предположить, что и исходное дерево было также полиплоидным, поскольку в мейозе при микроспорогенезе у него обнаружены нередуцированные микроспоры [6].

Среди диплоидных клонов карельской березы наименьший уровень миксоплоидии отмечен у клона Ш-3 (17%), тем не менее, он оказался в 2 раза выше по сравнению с клоном березы повислой (8,2%) аналогичной длительности культивирования *in vitro* (14 лет).

Цитогенетическое изучение рамет одного и того же клона Ia в процессе длительного культивирования *in vitro* (через год, 14 и 20 лет) показало, что с увеличением срока культивирования клон становился более однородным: наблюдалось существенное уменьшение (в 2,7 раза) уровня миксоплоидии, частоты ПМ (в 3 раза) и

спектра ПМ. Это может быть связано с клеточной и тканевой селекцией исходного миксоплоидного клона каллусного происхождения, характеризующегося в первые годы культивирования повышенной цитогенетической изменчивостью. Известно, что перепрограммирование генома (смена генетических и эпигенетических программ развития) при переходе клеток из дифференцированного к дедифференцированному состоянию и каллусообразованию сопровождается высоким уровнем геномной изменчивости [7]. Как показали наши исследования [8], снижение уровня миксоплоидии соматической ткани у клона Ia коррелировало с более поздним (начиная с 6-7 лет по сравнению с 4-5-летним возрастом у исходного клона) и менее выраженным в этом возрасте проявлением внешних признаков узорчатости древесины (вздутий на стволах). Тем не менее, у растений, полученных из культуры меристем или выращенных по обычной технологии (семенным путем) признаки узорчатости проявляются еще позже – в 10 – 12 лет, а иногда и в 20 лет.

При изучении диплоидных клонов разной длительности культивирования *in vitro* (Ia – 14 и 20 лет; Ш-3 и ПК-2 – 9 и 14 лет) различий в частоте патологий митоза не выявлено, это также свидетельствует об их цитогенетической стабильности.

Из трех проанализированных диплоидных

клонов наиболее высокой цитогенетической нестабильностью (а, следовательно, и генетической гетерогенностью соматических клеток) отличался фенотипически аномальный диплоидный клон Л, полученный через каллусные культуры. У него выявлены наибольшие (среди диплоидов) уровень миксоплоидии соматической ткани (35,6%), частота (8,7%) и спектр ПМ, рисунок 1.

Кроме того, у клона Л в соматических клетках каллуса была выявлена маркерная хромосома, фенотипически отличающаяся от всех остальных хромосом набора, которую мы условно назвали “рекомбинантная” или “ломкая” с сильно суженным районом плеча одной из 28-ми хромосом (рисунок 2). По-видимому, наблюдаемый сбой генетической программы развития, блокирующий нормальный ризогенез и приводящий к развитию аномального фенотипа, обусловлен комплексом генетических, эпигенетических и физиолого-биохимических факторов, в том числе достаточно высоким уровнем гетероплоидии соматической ткани (наблюдаемой на протяжении всего периода культивирования) и структурными нарушениями одной из хромосом. Известно, что перестройки хромосом вызывают существенные изменения экспрессии генов [9]. Подобный мутант представляет большой интерес для изучения генетики морфогенеза растений.

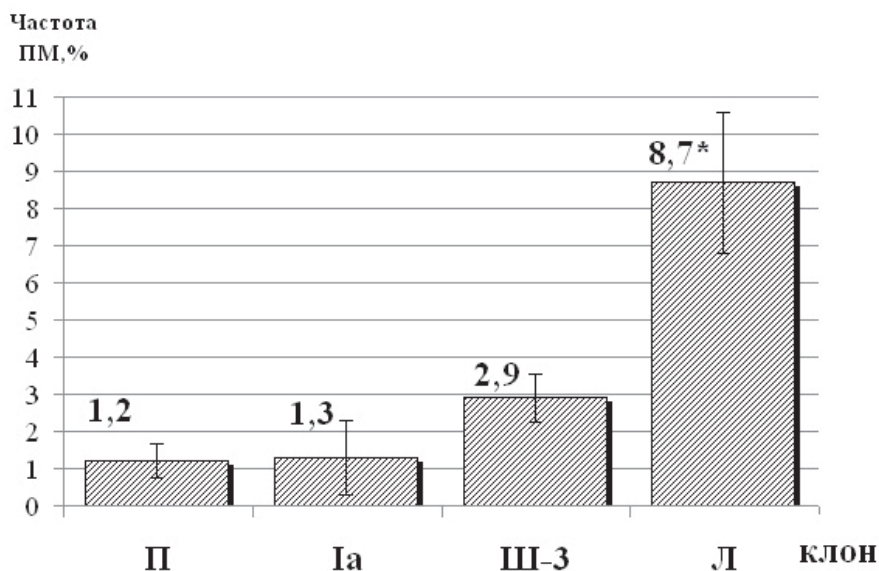


Рис. 1. Частота патологий митоза у растений диплоидных клонов березы после 14 лет культивирования *in vitro*.

* различия с другими клонами достоверны при $P < 0,01$

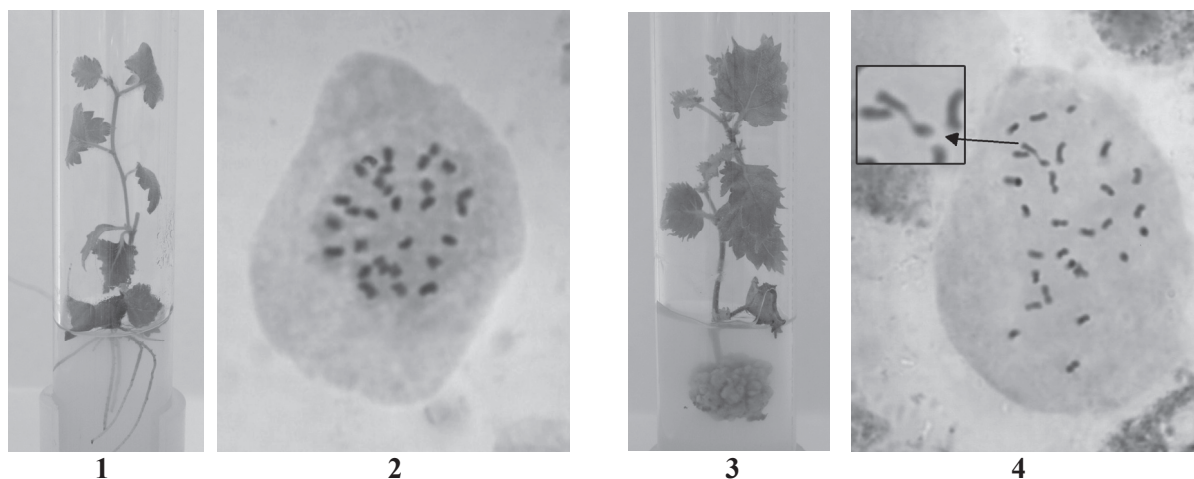


Рис. 2. Общий вид микрорастений и метафазные пластинки $2n=2x=28$ нормального клона Ш-3 (1, 2) и мутантного клона Л (3, 4). Указана морфологически измененная хромосома мутантного клона (4)

Выводы

Клоны узорчатых форм карельской березы, длительно культивируемые в условиях *in vitro*, характеризуются миксоплоидией. Уровень миксоплоидии соматической ткани (положительно коррелирующий с узорчатостью древесины) зависит от генотипических особенностей клонов, способа их получения и длительности культивирования. Наиболее высоким он был у полиплоидных клонов и диплоидных клонов, полученных через каллусные (а не меристемные) культуры.

Показано, что клоны карельской березы из коллекции в длительной культуре (14-20 лет) на питательных средах без гормонов сохраняют свои цитогенетические и фенотипические особенности: нормальный (клоны Ia, Ш-3, ПК-2, 1/39) или мутантный (клон Л с комплексом измененных признаков) фенотип. Поэтому предложенный нами подход длительного культивирования в условиях *in vitro* является эффективным методом для сохранения ценного генофонда карельской березы.

Литература

1. Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. – М.: Наука, 2005. – 269 с.
2. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, №6. – С. 950-953.
3. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Стратегия долгосрочного хранения *in vitro* коллекции ценных генотипов карельской березы // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сб. научн. тр. Т. 11. – К.: ЛОГОС, 2011. – С. 349-354.
4. Козьмин А.В., Буторина А.К. Спонтанный триплоид березы карельской // Лесоведение. – 1985. – №6. – С. 71-75.
5. Буторина А.К. О природе узорчатости древесины у карельской березы // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж: НИИЛГиС, 1993. – С. 40-47.
6. Соустова Н.М., Исаков Ю.Н. Особенности мейоза при микроспорогенезе у разных форм карельской березы // Проблемы лесоведения и лесоводства. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2005 – Вып. 63 – С. 179-181.
7. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения III: преобразование геномов. – Минск, 2011. – С. 1-53.
8. Машкина О.С., Буторина А.К., Табацкая Т.М. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины // Генетика. – 2011. – Т. 47, №8. – С. 1073-1080.
9. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Артемова Е.В. и др. Главное действие хромосомной перестройки – изменение работы регуляторных генов // Генетика. – 2004. – Т. 40, №7. – С.893-902.

ZELENINA E.A.^{1,2}, MASHKINA O.S.^{1,2}

¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding

Russia, 394087, Voronezh, 105, Lomonosova str, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University

Russia, 394006, Voronezh, 1, Universitetskaya square, e-mail: katy-green2009@yandex.ru

CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF COLLECTION OF CURLY BIRCH CLONES LONG-TERM CULTIVATED *IN VITRO*

Aims. Studying of cytogenetic stability of long-term cultivated curly birch clones. **Methods.** Cytogenetic characteristic have included frequency of mitotic abnormalities and mixoploidy level. **Results.** Clones cultivated on hormone-free medium for over 14-20 years conserved their cytogenetic and morphological characteristics both in normal clones and in mutants. **Conclusions.** Long-term cultivation on hormone-free medium is an effective method for conservation of valuable genofond of curly birch.

Key words: Curly birch, cytogenetic stability, long-term cultivation, mixoploidy.

ЗІНЧЕНКО М. О., БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО МЕТАБОЛІТІВ ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ, ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному рослин за дії стресових чинників в умовах *in vitro* вносить суттєвий вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Встановлено, що абіотичні стресори індують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляється на різних рівнях досліджень [1, 2]. На цитологічному рівні показано, що за присутності осмотичних речовин в середовищі культивування спостерігається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [3]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, спричинений надмірною кількістю активних форм кисню. Такі активні форми кисню можуть викликати пошкодження клітинних структур і макромолекул, в тім числі ДНК, індуючи утворення мутацій, зокрема делецій а також інші генетичні ефекти [4].

Одним із найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність, а потім з'ясувати природу соматональної мінливості є за-

стосування молекулярних маркерів, що ґрунтуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [5]. IRAP-аналіз (inter retrotransposon amplified polymorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між близько розташованими послідовностями ретротранспозонів. Однією з переваг цього методу є можливість одночасного аналізу багатьох локусів, локалізованих в різних ділянках геному, що особливо важливо при культивуванні *in vitro*. Поліморфізм в цьому випадку обумовлюється або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або безпосередньо транспозицією через вбудовування ретротранспозону в іншу ділянку ДНК.

У процесі добору стійких форм за клітинної селекції може виникати генетична мінливість, пов'язана як з умовами культивування, так і дією стресового чинника [6]. У зв'язку з цим, метою роботи було вивчення геномної мінливості клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (*G. graminis* var. *tritici*), за дії осмотичного стресу та регенерантів з них за використання цитологічного та IRAP-методу.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були калюсні лінії, отримані із експлантатів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин м'якої пшениці сорту Зимоярка та рослин R₂ соматона-

льних ліній цього ж сорту, стійких до збудника офіобольозної кореневої гнилі. Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили по розробленій нами методиці [7]. Для мо-