

## CYTOGENETIC MECHANISMS OF MANIFESTATION THE PATTERNED WOOD OF KARELIAN BIRCH DURING LONG-TERM IN VITRO CULTIVATION

*Mashkina O.S.<sup>1,2</sup>, Butorina A.K.<sup>1</sup>, Tabatskaya T.M.<sup>2</sup>, Shchetinkin S.V.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Voronezh State University. E-mail: olga\_mashkina@yahoo.com; <sup>2</sup> Research Institute of Forest Genetics and Breeding; <sup>3</sup> Branch of Federal state organization «Roslessozashita», «The Center of protection of forest of Voronezh region»

Abstract. Data of cytogenetically investigations of Karelian birch clone of patterned tall-growing forms with different duration of *in vitro* cultivation (1, 10, 11 and 18 years) are given. There was shown a positive correlation between patterned wood of birch and the level of mixoploidy of its somatic tissue, which is more displayed in plants received during the first years of cultivating of callus origin micro clone. Subsequently the intracellular selection leads to decrease the level of mixoploidy and, respectively, more late and less expressed of the patterned wood trait. We think that development of the character of patterned wood in Karelian birch considerably depends on mixoploidy level, which influences genetic heterogeneity of somatic tissue cells, changing their hormonal status and the character of gene expression.

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ УЗОРЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

*Машикина О.С.<sup>1,2</sup>, Буторина А.К.<sup>1</sup>, Табацкая Т.М.<sup>2</sup>, Щетинкин С.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет, 394006 г. Воронеж, Университетская пл., 1, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии. Тел. (4732)208876. E-mail: olga\_mashkina@yahoo.com

<sup>2</sup> ФГУП НИИ лесной генетики и селекции, 394087 г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105. Тел. (4732)539436. E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

<sup>3</sup> Филиал ФГУ «Российский центр защиты леса»-«Центр защиты леса Воронежской области», 394087 г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105. Тел. (4732)35-71-45. E-mail: czl-voronezh@mail.ru

Повышенный интерес к изучению карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) объясняется ее большой хозяйственной ценностью из-за высокодекоративной узорчатой текстуры древесины. В отличие от других представителей рода *Betula* L., для карельской березы на всех изучаемых уровнях организации (клеточном, хромосомном, тканевом, организменном) отмечается природная гетерогенность. На организменном уровне, например, это проявляется в большом формовом разнообразии, как по особенностям роста, так и по качеству и текстуре древесины. Формирование карельской березы происходило в экстремальных почвенно-климатических условиях, которые не могли не оказать влияния на ее морфо-биологические особенности и особенности метаболизма. Генетические ресурсы карельской березы довольно ограничены, а потребность в древесине высокая, что ставит перед лесоводами задачу разработки эффективных способов размножения ее узорчатых форм, для чего необходимо знание механизмов формирования узорчатости древесины и закономерностей наследования этого признака.

Природа узорчатости древесины до сих пор не ясна, несмотря на существование большого количества гипотез и предположений: вирусная (инфекционная) [13], интеграционная [6], гормональная [7], негормональная (нарушение углеводного обмена) [11], гибридогенная [1], эколого-генетическая [4] и др. Недостаточно изучен характер проявления этого ценного признака у микроразмноженных клонов, особенно после длительного культивирования *in vitro*. Как показали наши исследования [9,10], длительное культивирование (и микрочеренкование) *in vitro* является одним из эффективных подходов воспроизводства и сохранения (консервации *ex situ*) ценных генотипов карельской березы, а также представляет удобную модель для изучения механизмов проявления узорчатости древесины при вегетативном размножении.

Целью настоящих исследований явилось изучение цитогенетической стабильности, особенностей роста и характера проявления узорчатости древесины у растений одного и того же клона «Ia» каллусного происхождения узорчатой высокоствольной формы карельской березы в процессе длительного (свыше 18 лет) субкультивирования *in vitro*.

Известно, что при длительном субкультивировании растительной ткани (особенно каллусной) на средах, обогащенных фитогормонами цитокининовой или ауксиновой природы, с увеличением срока культивирования могут возникать и накапливаться значительные генетические изменения, обуславливаю-

щие нестабильность генома. Причем, даже оптимальный уровень растительных гормонов при длительном культивировании часто приводит к соматклональной или эпигенетической изменчивости растений.

Нами был предложен подход [9], уменьшающий вероятность возникновения соматклональной изменчивости при многолетнем субкультивировании: полное исключение фитогормонов из состава питательных сред. Длительное субкультивирование растений-регенерантов исходного клона осуществлялось с интервалом раз в 4–6 месяцев на безгормональной питательной среде  $\frac{1}{2}$  MS или  $\frac{1}{2}$  WPM с высадкой растений в питомник через год, 10 и 11 лет культивирования *in vitro*. Общий биологический возраст анализируемых растений (произрастающих в питомнике или находящихся в пробирочной культуре) составил 18 лет (табл., рис. 1).

Таблица. Морфометрическая и цитогенетическая характеристика растений клона Ia разной длительности культивирования *in vitro*

Анализируемые показатели	Длительность культивирования <i>in vitro</i> / возраст растений, лет			
	1/17	10/8	11/7	18/0
Число изученных растений	223	50	50	–
Высота растений, м	9,3±0,04	4,6±0,08	2,4±0,03	–
% низкорослых растений**	0,9	0,0	0,0	–
% многоствольных растений	66,0	0,0	0,0	–
% растений с признаками узорчатой древесины	100,0	48,0	20,0	–
Число делящихся клеток	2625	–	5024	1061
Патологии митоза (ПМ), %	4,3±0,7	–	1,3±0,1*	1,4±0,2*
Пределы варьирования ПМ, %	0,9–7,8	–	0,0–2,6	0,0–2,4
Уровень миксоплоидии	25,5±2,6	–	9,4±0,7*	9,6±1,1*

\* различия с исходным клоном (1 год культивирования *in vitro*) достоверны при  $P < 0,01$ ; \*\* – высота низкорослых растений в 9-летнем возрасте – 1,5–2,7 м.

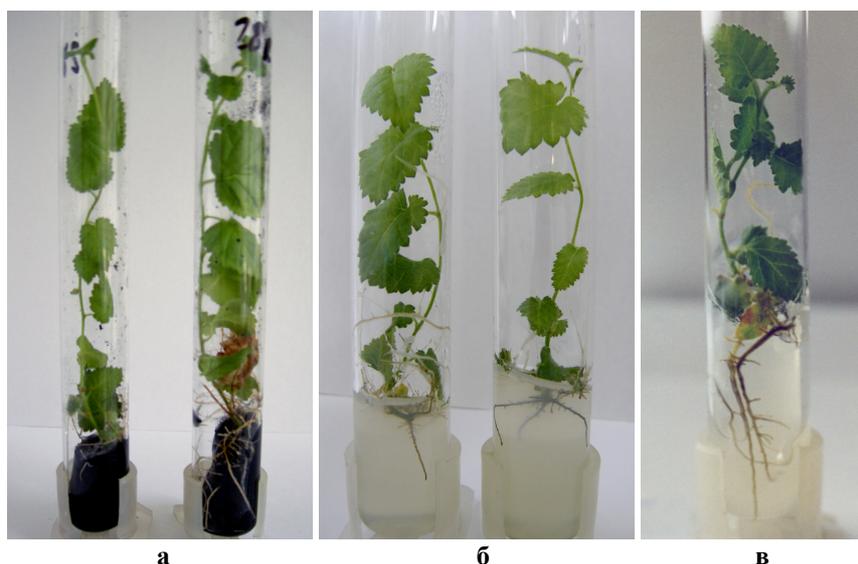


Рисунок 1. Общий вид микрорастений клонов карельской березы длительного (18 лет) срока культивирования *in vitro*.

а – клон Ia высокоствольной формы; б – клон Тр. триплоидной высокоствольной формы; в – клон А полукустовидной формы

Цитогенетическую стабильность оценивали по частоте патологий митоза (процент клеток с нарушениями в мета-, ана-, телофазе митоза от общего числа просмотренных делящихся клеток) в листовой меристеме и уровню миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модального диплоидного,  $2n=2x=28$ ). Об узорчатости древесины и степени ее выраженности судили по косвенным показателям (наличию и величине вздутий на внешней поверхности ствола), а также по данным анатомического анализа.

Результаты исследований показали, что растения исходного клона, высаженные в питомник после одного года культивирования *in vitro*, характеризовались более высокой фенотипической и цитогенетической неоднородностью (а, следовательно, и генетической гетерогенностью соматической ткани) по сравнению с растениями длительного (10–18 лет) срока культивирования (табл., рис. 2 и 3). Это может быть связано с клеточной и тканевой селекцией клона каллусного происхождения в процессе его многолетнего культивирования на безгормональной питательной среде. Наряду с типичными по росту растениями, отмечено появление отдельных карликов (с частотой 0,9 %) и значительного количества (66 %) многоствольных рамет. Ценным свойством явилось раннее (с 3–5 лет), полное (у всех деревьев к 5–8-летнему возрасту) и хорошо выраженное проявление внешних признаков узорчатости древесины. Отмеченные особенности были характерны и для других клонов карельской березы каллусного происхождения (высокоствольной, полукустовидной и кустовидной форм). У растений, полученных из культуры меристем или выращенных по обычной технологии (семенным путем), признаки узорчатости проявляются позже – в 10–12 лет.

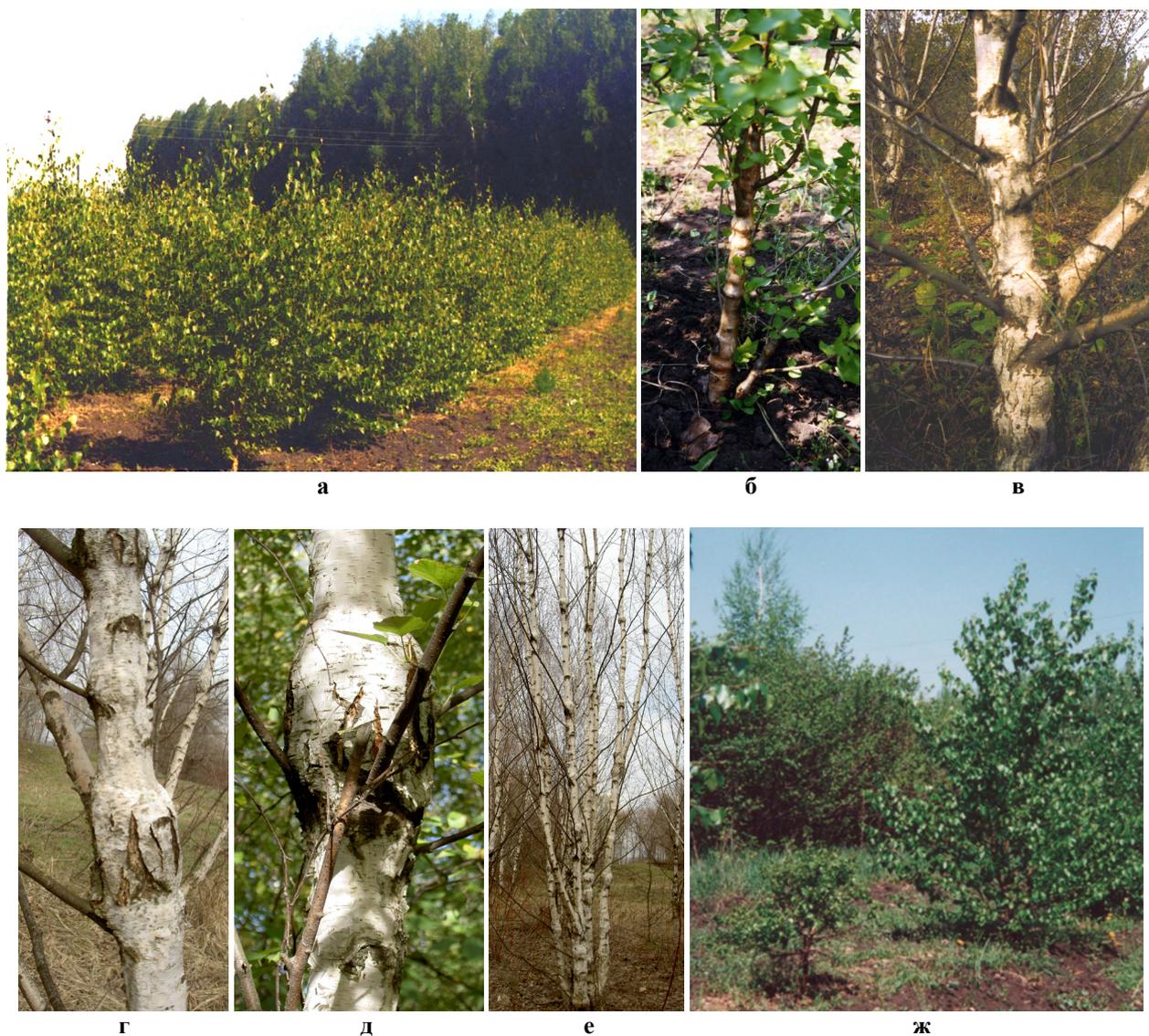


Рисунок 2. Общий вид плантационных культур (а) и отдельных рамет клона (б-ж) высокоствольной формы карельской березы, выращенных из растений-регенерантов каллусного происхождения после одного года культивирования *in vitro*. Семилукский питомник, Воронежская обл.

а – плантационные культуры в возрасте 5 лет; б-д – хорошо выраженные вздутия на поверхности ствола у растений-регенерантов в возрасте 5-ти (б), 6-ти (в), 16-ти (г) и 18-ти (д) лет; е-ж – соматоклональные варианты: многоствольная рамета в возрасте 16 лет (е) и карлик (на переднем плане) в возрасте 5 лет.

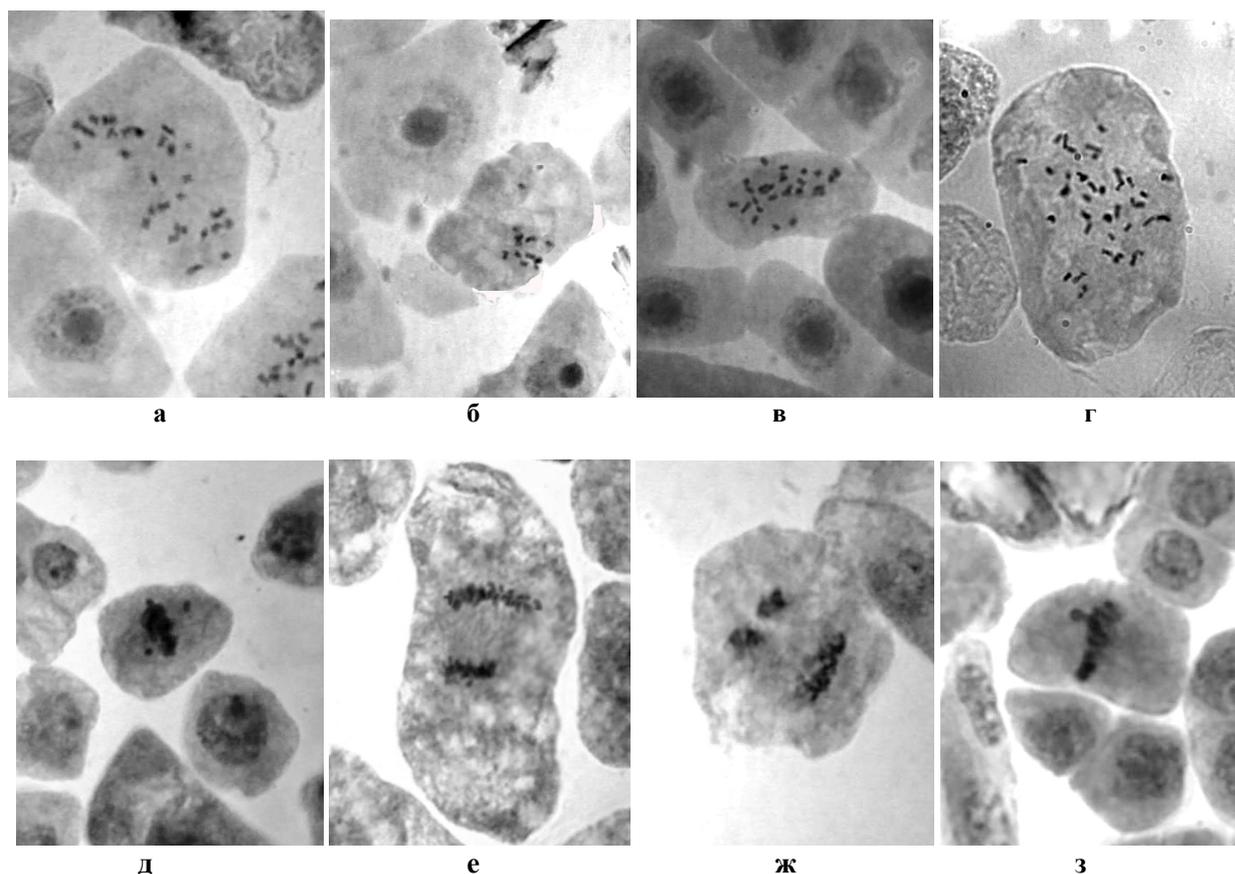


Рисунок 3. Примеры метафазных пластинок (а-г), типов патологий митоза (д-ж) и остаточное ядрышко (з), выявленных в клетках листовой меристемы миксополидного исходного клона Ia карельской березы, прошедшего один год субкультивирования *in vitro*. Увеличение 10x x 100x x 1,5x.

а –  $2n=2x=28$  (модальное диплоидное число хромосом); б – 11 ( $n=3$ ); в – 24 ( $2n=4$ ); г – 34 ( $2n=6$ ); д – отставание хромосом в метакинезе; е – неравноценное расхождение хромосом в анафазе; ж – трехполюсный митоз; з – остаточное ядрышко в метафазе

Анатомическое изучение 3-летних растений-регенерантов подтвердило наличие у них аномальных структур стебля, характерных для узорчатой древесины: обширные участки паренхимной ткани и ложных годичных слоев, формирование ложно-широких лубо-древесинных лучей [15] (рис. 4). Причем, у растений каллусного происхождения аномальный гистогенез был более выражен по сравнению с растениями, полученными через культуру меристем. Особый интерес представляют выявленные в 1–3-летнем стебле специфические структуры – сфероиды, образующиеся в результате аномальной активности локальных групп инициалей латеральной меристемы – камбия. Производные таких камбиальных инициалей как бы закручены в спираль. Подобные структуры мы наблюдали в стебле карельской березы, березы повислой и ольхи черной, однако у растений-регенерантов в этом процессе участвуют значительно более многочисленные группы инициалей и диаметр «спиралей» в однолетнем стебле достигает 300–500 мкм. Образование сфероидов связано, по-видимому, с функционированием переходных по своему типу, укороченных, видоизмененных, с нарушенной пространственной ориентацией камбиальных клеток. Последнее обстоятельство может свидетельствовать о существенных нарушениях пloidности инициалей латеральной меристемы растений-регенерантов. Повторное изучение этих же растений-регенерантов в 18-летнем возрасте показало, что их древесина имеет хорошие декоративные свойства, связанные с формированием типичной узорчатой древесины карельской березы (рис. 5.).

После длительного (10, 11 лет) культивирования *in vitro* не отмечено ни одного случая внутривидовой изменчивости (отсутствуют карлики, все растения клона одноствольные), а также раннего проявления внешних признаков узорчатости (рис. 6). Первые внешние признаки узорчатости

начали проявляться с 6–7 лет у части рамет и были менее выражены по сравнению с растениями исходного клона того же возраста. Растения исходного клона были миксоплоидными ( $74,5 \pm 2,5$  % диплоидных клеток и  $25,5 \pm 2,6$  % – анеуплоидных), что в целом характерно для карельской березы [2, 3]. С увеличением длительности культивирования наблюдалось существенное уменьшение частоты (в 3 раза) и спектра патологических митозов, а в результате этого, и уровня миксоплоидии (в 2,7 раза). Причем, только у исходного клона были отмечены случаи появления остаточных ядрышек на стадиях метафазы-телофазы митоза (рис. 3), присутствие которых рассматривают, как проявление эпигенетической изменчивости и связано с активностью генов рибосомальных цистронов, обычно ингибированных на этой стадии, что приводит к синтезу измененного состава белков.

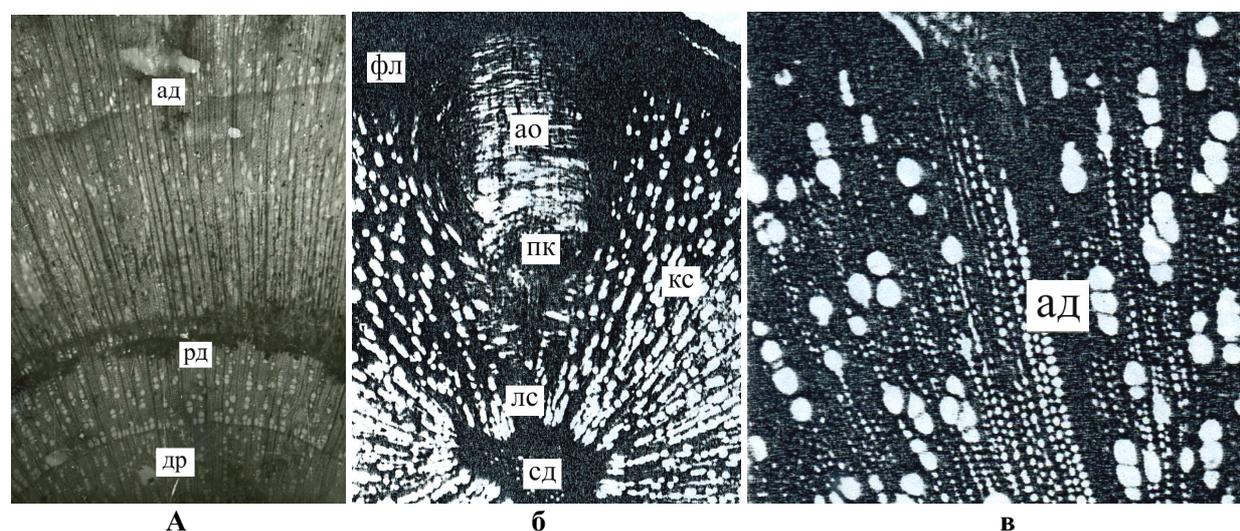


Рисунок 4. Анатомическая структура древесины (поперечные срезы) однолетних (б) и 3-летних (а,в) стеблей растений-регенерантов исходного клона карельской березы.

др – нормальная древесина, рд – раневая древесина, ад – anomальная древесина, ао – anomальное образование (сфероид), сд – сердцевина, пк-паренхимные клетки сфероида, фл – флоэма, кс – ксилема, лс – листовый след

На наш взгляд, причиной фенотипической и цитогенетической неоднородности рамет исходного клона явился целый комплекс факторов, связанных с биологическими особенностями карельской березы и вызванных условиями культивирования (стрессорирующими факторами). Это: наличие и реализация исходной (предсуществующей) гетерогенности (имеющейся в геноме узорчатых форм карельской березы по уровню плоидности и миксоплоидии, содержанию и балансу эндогенных гормонов и др.); отсутствие регулирующего влияния со стороны интактного растения; влияние модифицирующего или мутагенного действия условий культивирования (в частности фитогормонов, используемых нами на первых этапах культивирования); микроклональное размножение через каллусные культуры, характеризующиеся достаточно высоким уровнем геномной изменчивости, что могло привести к индукции дополнительной изменчивости при переходе клеток из дифференцированного к дедифференцированному состоянию.

Внутриклоновые различия выявлены и на гормональном уровне. У растений того же клона Ia, высаженных в питомник после одного года культивирования *in vitro*, отмечен более высокий уровень и удельный вес регуляторов роста индольной природы (ауксины) и меньший – ингибиторов роста фенольной природы по сравнению с растениями, высаженными в питомник после 11 лет культивирования *in vitro* [14].

Таким образом, узорчатость древесины у карельской березы положительно коррелирует со степенью миксоплоидии соматической ткани и ее гормональным статусом. Это дает нам возможность предположить, что на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы существенное влияние оказывает уровень миксоплоидии, который обуславливает генетическую гетерогенность клеток соматической ткани, изменяющую их гормональный статус и характер экспрессии генов.

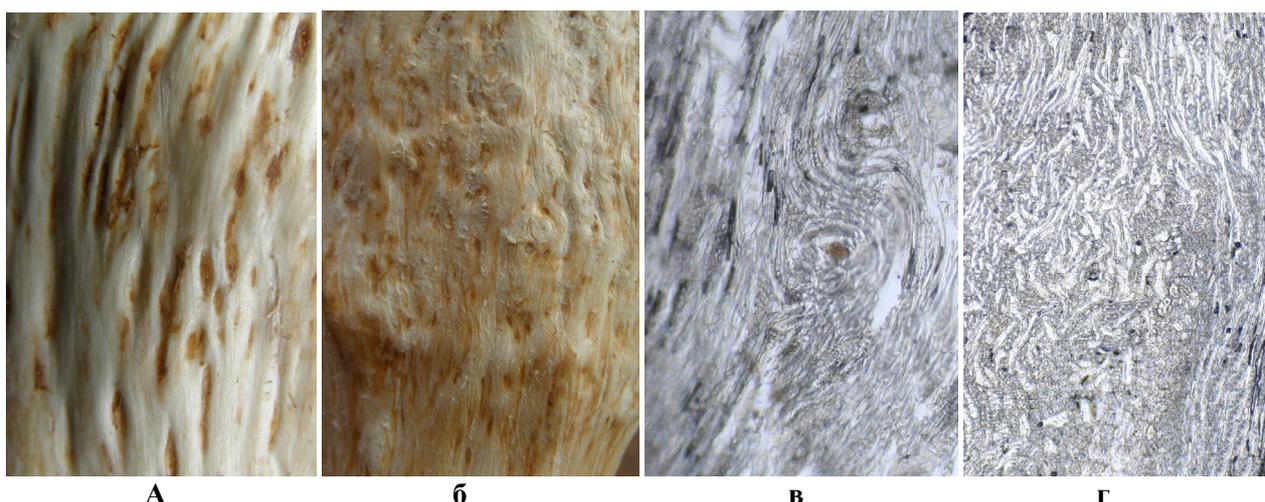


Рисунок 5. Ямчатая поверхность древесины под снятой корой (а,б), тангентальный срез узорчатой древесины (в,г) 18-летних деревьев карельской березы, выращенных из микрорастений после одного года культивирования *in vitro*.

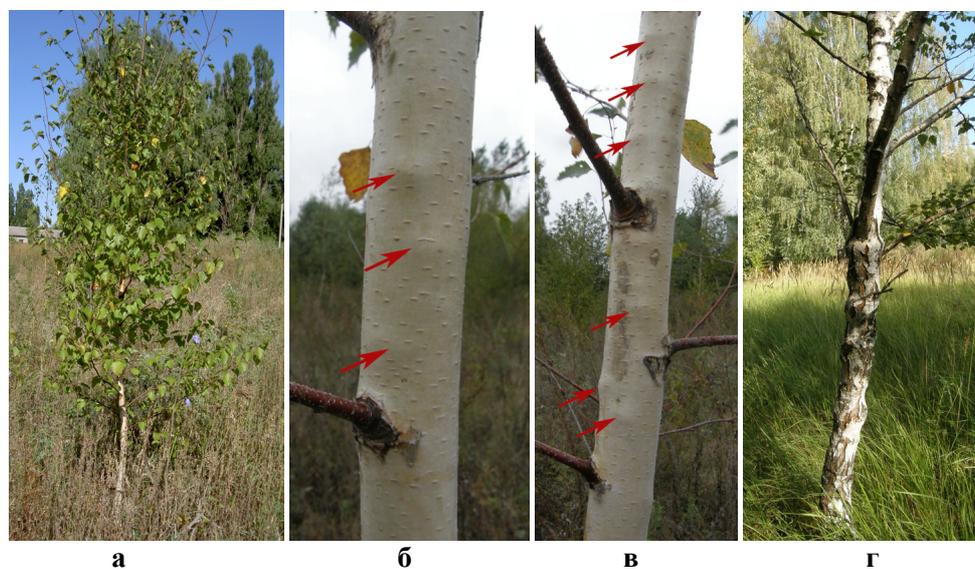


Рисунок 6. Общий вид одноствольных рамет клона высокоствольной формы карельской березы с различной степенью проявления внешних признаков узорчатости древесины после 10 лет культивирования *in vitro*. Семилукский питомник, Воронежская обл.

а – растение в возрасте 8 лет без внешних признаков узорчатости древесины; б,в – на стволах видны небольшие вздутия (указаны стрелками) – начало проявления внешних признаков узорчатости древесины в возрасте 8 лет (б) и 11 лет (в); хорошо выраженные вздутия на поверхности ствола у 11-летнего растения.

По мнению ряда ученых [5,8,12,16 и др.], формирование и проявление узорчатой древесины связано с наличием у карельской березы особого генотипа: присутствием специфического гена или скорее группы генов (полигенов) с количественным характером наследования, которые кодируют ее отличительные признаки. Известно, что формирование и проявление узорчатой древесины происходит в условиях специфического сочетания факторов внешней среды: температуры, освещенности, влажности и плодородия почвы. Это позволило рассматривать карельскую березу как экологическую форму березы повислой [4,11]. По данным Л.Л. Новицкой [11], нарушение углеводного обмена (избыточное содержание сахарозы – активного индуктора морфогенеза, в проводящей флоэме и камбиальной зоне) карельской березы вызывает образова-

ние специфических структурных изменений ткани, приводящих к узорчатой древесине, т. е. проявление признака узорчатости древесины находится под контролем целого комплекса генетических и средовых факторов.

Как показали наши исследования, различия в проявлении узорчатой древесины у клона разной длительности культивирования обусловлены как генетической изменчивостью (миксоплоидией тканей, различными цитогенетическими аномалиями в клетках), так и эпигенетической (изменением физиологического состояния клеток при воздействии экстремальных факторов окружающей среды).

Приводя к полиморфизму клеточных популяций по числу хромосом, миксоплоидия ведет также к изменениям состояния генов в связи с усложнением передачи сигналов от генов к признаку в ядрах разного уровня плоидности (диплоидных, гипо- и гиперанеуплоидных, гаплоидных), способным привести к гормональному дисбалансу и нарушению структуры ткани, что следует рассматривать как эпигенетические изменения, поскольку они не связаны с изменением структуры ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов О.Ю., Марковская Ю.А. Особенности генетической структуры березы карельской по гену *Gri-2* // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения). Гомель: ИЛ НАН Беларуси. 2003. Вып. 59. С.181–185.
2. Буторина А.К. Цитогенетика хозяйственно-ценных форм карельской березы // Генетика. 1985. Т. 21. №7. С. 1192–1198.
3. Буторина А.К. О природе узорчатости древесины у карельской березы // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. Воронеж: НИИЛГиС, 1993. С. 40–47.
4. Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* LM.: Наука, 2005. 269 с.
5. Ермаков В.И. Закономерности наследования текстуры древесины в гибридном потомстве березы карельской // Селекция и лесное семеноводство в Карелии. Петрозаводск, 1979. С. 4–20.
6. Исаков Ю.Н. О природе исключительно высокого фенотипического полиморфизма березы карельской // Фенетика популяций. М., 1985. С. 65–66.
7. Косиченко Н.Е., Щетинкин С.В. Структурные аспекты дифференциации и диагностики узорчатости древесины березы карельской // Современные аспекты древесиноведения. Красноярск, 1987. С. 27–29.
8. Любавская А.Я. Карельская береза М.: Лесн. пром-ть., 1978. 58 с.
9. 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.
10. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Длительное культивирование в условиях *in vitro* как один из способов сохранения представителей ценного генофонда карельской березы // Достижения и проблемы лесной генетики и селекции. Воронеж: НИИЛГиС, 2010. С. 31–52.
11. Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Версо, 2008. 144 с.
12. Романовский М.С. Статистический подход к описанию полиморфизма карельской березы // Генетика. 1986. Т. 22. № 1. С. 86–94.
13. Сакс К.А. Опыт по выращиванию карельской березы в Латвийской ССР // Лесная генетика, селекция и семеноводство. Петрозаводск, 1970. С. 294–300.
14. Самсонова А.Е., Машкина О.С., Табацкая Т.М. Физиолого-биохимические особенности клонов карельской березы разной длительности культивирования в условиях *in vitro* // Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе. Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2009. С.127–130.
15. Табацкая Т.М., Машкина О.С., Щетинкин С.В. Технология *in vitro* в создании плантационных культур карельской березы // Генетика и селекция – на службе лесу. Воронеж: НИИЛГиС, 1997. С. 63–66.
16. Ruden I. Om valbjork og endel andre unormale veddannelser hos bjork // Medd. Fra. Det. Norske Skogforsoksv. 1954. Bd. 43. № 12. S. 451–505.