

# ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МИКСОПЛОИДОВ ТОПОЛЯ БЕЛОГО (*POPULUS ALBA* L.) ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ (*IN VITRO* И *IN VIVO*)

О.С. Машкина, М.В. Рябых

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия  
gen185@bio.vsu.ru

Тополь – одна из быстрорастущих и хозяйственно-ценных древесных пород, а также удобный модельный объект для генетико-селекционных исследований. Это первое древесное растение и третий растительный объект после арабидопсиса и риса, у которого в 2006 году была определена полная нуклеотидная последовательность генома. Тополь наиболее продвинул в селекционном отношении. Для него получены не только гибриды, но и сорта. Особый практический интерес представляют триплоидные тополя ( $2n=3x=57$ ), нередко проявляющие соматический гетерозис. Практическая ценность миксоплоидов (характеризующихся наличием в тканях клеток с различным числом хромосом) заключается в довольно частом сочетании у них высокой продуктивности с адаптивностью к различным экологическим условиям (в том числе экстремальным), что важно для создания полезащитных полос и озеленения в промышленных городах, испытывающих антропогенную нагрузку. Тополя, как правило, хорошо размножаются с помощью традиционного метода черенкования. В тоже время многие ценные формы (в частности, тополя белого (*P. alba* L.), значительно превосходящие по продуктивности древостоев и качеству древесины тополя других видов), относятся к трудночеренкуемым, что сдерживает их использование в плантационных насаждениях. Для таких тополей актуальным является совершенствование приемов вегетативного размножения, не вызывающих изменений их ценного генома. В 80-х гг. XX века нами была получена целая серия мейотических автотриплоидов тополя белого, а позже разработан эффективный метод их клонального микроразмножения, с помощью которого было клонировано 7 геномных мутантов, перспективных для лесного хозяйства и озеленения. В 1996 году в Семилукском питомнике Воронежской обл. создана опытная плантация из однолетних растений-регенерантов и черенковых саженцев. Цель работы – сравнительная оценка цитогенетической стабильности 11-летних клонов т. белого, полученных традиционным способом (черенкованием в пленочной теплице - *in vivo*), или путем микрочеренкования *in vitro* двух продуктивных автотриплоидных гибридов, имеющих миксоплоидную природу. На подобных моделях (*in vitro* и *in vivo*) исследования ранее не проводились. Исходные деревья № 155/83 и 11/83 экспериментально получены нами путем опыления диплоидных растений т. белого искусственно синтезированной с помощью повышенной температуры нередуцированной диплоидной пылью того же вида. Деревья имеют миксоплоидную природу триплоид-диплоидного типа с преобладанием в их тканях клеток с 57 хромосомами (более 80 %). Пол мужской. Укореняемость черенков *in vivo* была существенно ниже (в среднем  $29,9 \pm 6,3$  %), чем в условиях *in vitro* (в среднем  $94,8 \pm 2,2$  %). Размноженные *in vitro* клоны отличались однородностью по росту (коэффициент вариации 12,5 и 13,5 %) по сравнению с растениями клонов, полученных обычным черенкованием в теплице (С.в. 31,4 и 40,6 %). Имели достоверно более высокие значения по высоте, сохраняли характерные для исходных генотипов особенности роста, габитус, характеризовались отсутствием аномально развитых растений. Цитогенетическое изучение вегетирующих клонов (по 4 раметы для каждого) проводилось в клетках листовой меристемы распускающихся вегетативных почек (таблица).

Таблица

Цитогенетическая характеристика двух клонов тополя (115/83 и 11/83), созданных при разных способах вегетативного размножения

Цитогенетические показатели, %	155/83	11/83
--------------------------------	--------	-------

	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Уровень нарушений митоза	4,3 ± 0,5	3,7 ± 0,3	10,9 ± 1,5	3,1 ± 0,3*
Спектр патологий митоза:				
- мосты	44,1 ± 3,4	28,8 ± 3,1*	50,0 ± 3,5	27,9 ± 3,1*
- отставания хромосом в метакинезе	29,6 ± 3,1	36,7 ± 3,3	24,4 ± 2,9	34,4 ± 3,3
- отставания хромосом в анафазе	26,3 ± 3,0	34,5 ± 3,2	25,6 ± 2,9	37,7 ± 3,4
Частота встречаемости клеток с n числом ядрышек				
1	84,7 ± 2,2	87,7 ± 1,4	78,7 ± 2,1	89,4 ± 2,8
-“- 2	11,1 ± 2,0	9,7 ± 1,2	15,5 ± 0,9	8,6 ± 2,5
-“- 3	3,1 ± 0,5	2,2 ± 0,2	4,2 ± 0,5	1,9 ± 0,5
-“- 4	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,06	1,0 ± 0,3	0,1 ± 0,04
-“- 5	0,3 ± 0,1	0	0,6 ± 0,1	0
Всего клеток с 3, 4 и 5 ядрышками	4,2 ± 0,2	2,6 ± 0,3*	5,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2*
Доля клеток с типами ядрышек:				
- “кора-сердцевина”	90,5 ± 2,5	90,5 ± 1,2	89,6 ± 1,1	92,9 ± 1,5
- “кора-сердцевина” с вакуолью	3,9 ± 0,8	6,1 ± 1,5	4,2 ± 0,6	4,8 ± 1,2
- компактные	5,6 ± 0,6	3,4 ± 0,3*	6,2 ± 0,6	2,3 ± 0,4*

\* - различия между вариантами по способу получения клонов достоверны при  $P < 0,001$

Установлено, что независимо от способа получения, клоны сохраняли уровень плоидности и миксоплоидии, присущие исходным деревьям. Клетки с модальным триплоидным числом хромосом составляли 76-91 %. На долю диплоидных ( $2n=2x=38$ ) клеток приходилось 9-24 %. У отдельных рамет клона 11/83, размноженного *in vivo*, выявлены клетки с гипо- и гипертриплоидным ( $3x\pm 2-4$ ) набором хромосом. Размноженные *in vitro* клоны характеризовались более высокой внутриклоновой однородностью по частоте и спектру нарушений митоза, ядрышковой активности (числу и типам ядрышек в ядре) по сравнению с клонами, полученными обычным черенкованием (*in vivo*). У последних повышен уровень патологических митозов (табл.) и расширены пределы варьирования показателя (от 0 до 27%, против 0-7% у рамет клонов, размноженных *in vitro*); отмечено преобладание в общем спектре мостов в анафазе, что может свидетельствовать о более высоком уровне мутационного процесса. Повышена метаболическая активность клеток (увеличено количество интерфазных клеток с 3-5 ядрышками (вместо 1-2 в норме) и высокоактивных компактных ядрышек), которая, возможно, направлена на компенсацию повышенной хромосомной нестабильности клонов. Таким образом, клонам, полученным традиционным способом (*in vivo*), характерна более высокая внутриклоновая генетическая неоднородность. В тоже время, степень цитогенетической нестабильности у различных клонов неодинакова.

Наблюдаемые между клонами различия, на наш взгляд, могут быть обусловлены следующими причинами. 1. Существенно более низкой укореняемостью побегов в условиях теплицы и менее развитой корневой системой у черенковых саженцев (по сравнению с размноженными *in vitro* растениями), что в свою очередь, может вызвать физиологические нарушения, нарушить процессы клеточного деления, роста и развития растений. 2. Изменением у отдельных рамет клона оптимального для исходного дерева сочетания и соотношения клеток разного уровня плоидности. Так, достоверное повышение уровня патологических митозов у клона 11/83 *in vivo*, могло стать причиной появления анеуплоидных клеток и хромосомных aberrаций, изменения уровня миксоплоидии (гетерогенности) клеточной популяции, возрастания риска генетических изменений. 3. Различиями в степени цитогенетической гетерогенности исходного для размножения материала. Клон, полученный *in vitro*, представлен вегетативным потомством одного экспланта (узлового сегмента с одной пазушной почкой), а *in vivo* - совокупностью черенковых саженцев, полученных от разных побегов (черенков) исходного дерева (один черенок – одно растение), которые могут различаться уровнем миксоплоидии. 4. Различиями в возможностях используемых методов вегетативного размножения. Микроклональное

размножение осуществлялось нами путем пролиферации пазушных меристем с последующим микрочеренкованием образующихся микропобегов. Т.е. применялись меристемные, а не каллусные культуры, характеризующиеся достаточно высоким уровнем геномной изменчивости. Кроме того, ограничение применения гормональных питательных сред при культивировании первичных эксплантов и полное исключение фитогормонов из состава питательных сред на этапе мультипликации (собственно микроклональном размножении), уменьшает возможность возникновения соматклональной изменчивости и обеспечивает цитогенетическую стабильность и однородность клонов. Известно, что различные условия культивирования (например, на средах, обогащенных гормонами цитокининовой или ауксиновой природы), могут привести к хромосомной нестабильности, амплификации различных генов, изменению характера метилирования ДНК, активизации мобильных генетических элементов и др. Это в свою очередь приводит к изменению характера генной экспрессии и нестабильности генома в целом.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения разработанного нами метода клонового микроразмножения для тиражирования трудночеренкуемых ценных генотипов тополя белого и получения стандартного посадочного материала, сохраняющего цитогенетические особенности исходных деревьев; для сохранения ценных и уникальных генотипов путем создания коллекционных участков и поликлоновых плантаций (консервация *ex situ*).

## **МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДОННИКА ЗУБЧАТОГО ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**А.Н. Мунтян, Е.Е. Андронов, Е.П. Чижевская, М.Л. Румянцева, Б.В. Симаров**

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,*

*РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия*

*amuntyan@rambler.ru*

В настоящее время проблема хлоридного засоления остро встает не только в России, но и в прилегающих странах ближнего зарубежья. Согласно последним данным использование солерезистентного бобово-ризобияльного комплекса приводит к частичному восстановлению засоленных почв. Соответственно, важной задачей при рекультивационных мероприятиях является увеличение симбиотической эффективности, которая, в свою очередь, в значительной степени зависит от генотипа растения-хозяина.

Целью данной работы является изучение генетического разнообразия дикорастущих форм донника, собранного в Приаральском генцентре (условия экстремального засоления) и Северо-Кавказском генцентре (без засоления).

Были выбраны два географически удаленных района из Приаральского генцентра (по 20 растений из каждого сайта) и один район из Северо-Кавказского генцентра (по 20 растений).

Для выяснения генетических особенностей дикорастущих форм донника использовался комплексный подход, включающий RAPD-анализ, а также определение нуклеотидной последовательности межгенных участков рибосомальной ДНК (ITS-регион) и участков гена NFR5, кодирующего рецепторы Nod-сигнала.

В результате проведенного RAPD-анализа выявлены существенные различия между приаральскими и северо-кавказскими популяциями, кроме того, обнаружены четкие различия между субпопуляциями приаральского региона (рис. 1).