

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 582.632.1+630*81:[581.81:581.165.73]

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-5-390-394>

Поступило в редакцию 14.08.2024

Received 14.08.2024

С. В. Пантелеев¹, Л. В. Ветчинникова², член-корреспондент РАН А. Ф. Титов³,
П. С. Кирьянов¹, член-корреспондент НАН Беларуси О. Ю. Баранов⁴

¹Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

²Институт леса Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр
Российской академии наук», Петрозаводск, Российская Федерация

³Институт биологии Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр
Российской академии наук», Петрозаводск, Российская Федерация

⁴Национальная академия наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ДРЕВЕСИНЫ И КОРЫ ПРИВИВОК РАЗНЫХ ВИДОВ БЕРЕЗ

Аннотация. С использованием семи микросателлитных маркеров проведен молекулярно-генетический анализ полученных в результате прививки копулировкой или кольцевой локальной трансплантации коры фрагментов тканей ствола карельской березы и березы повислой. Установлено, что независимо от способа прививки каждый из компонентов после срастания тканей устойчиво сохраняет свой генотип. Показано, что при кольцевой трансплантации, когда «перерезаются» все нисходящие и восходящие транспортные потоки по окружности ствола вдоль его оси, в местах срастания тканей коры и древесины могут формироваться aberrantные клетки. Но и в этом случае карельская береза и береза повислая сохраняют свои не только фенотипические (узорчатая и прямолинейная текстура древесины соответственно), но и генотипические особенности (что выражается в сохранении сочетания выявленных аллельных вариантов).

Ключевые слова: SSR-маркеры, карельская береза, *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, береза повислая, *Betula pendula* Roth, прививка, трансплантация тканей, узорчатая древесина, генотипы

Для цитирования. Молекулярно-генетический анализ тканей древесины и коры прививок разных видов берез / С. В. Пантелеев [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 5. – С. 390–394. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-5-390-394>

Stanislav V. Panteleev¹, Lidiya V. Vetchinnikova², Corresponding Member RAS Alexander F. Titov³,
Pavel S. Kiryanov¹, Corresponding Member of the NAS of Belarus Oleg Yu. Baranov⁴

¹Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

²Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation

³Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

⁴National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF WOOD AND BARK TISSUE VACCINATIONS OF DIFFERENT-TYPE BIRCH

Abstract. Seven microsatellite markers were used in molecular genetic analysis of curly birch and silver birch trunk tissue fragments produced through whip grafting or bark ring transplantation. The analysis showed that whichever grafting method was used, each component steadily retained their genotype upon tissue fusion. It is demonstrated that aberrant cells may be formed at the point of bark and trunk tissue fusion after donor bark ring transplantation, when all the ascending and descending transport pathways along the recipient's trunk axis have been severed all around the trunk circumference. Even then, however, both curly birch and silver birch retain their phenotypic (figured and straight wood grain, respectively) as well as genotypic (which is expressed in preserving a combination of identified allelic variants) traits.

Keywords: locus SSR markers, curly birch, *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, silver birch, *Betula pendula* Roth, grafting, tissue transplantation, figured wood, genotypes

For citation. Panteleev S. V., Vetchinnikova L. V., Titov A. F., Kiryanov P. S., Baranov O. Yu. Molecular genetic analysis of wood and bark tissue vaccinations of different-type birch. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 5, pp. 390–394 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-5-390-394>

Введение. Текстура и окраска древесины являются основными характеристиками, определяющими ее декоративные достоинства. Среди представителей европейской лесной дендрофлоры наиболее широкую известность получила высокоценная узорчатая древесина карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti), причины появления узорчатости по-прежнему остаются предметом дискуссии. В этом плане новые возможности открывает применение современных молекулярно-генетических методов исследования. Так, недавно появился ряд публикаций, в которых рассматривается роль апопластного транспорта сахарозы в формировании узорчатой древесины, связанная с экспрессией генов семейств *SUT* и *SWEET* (кодирующих транспортеры сахарозы) [1], а также *CWINV* и *SUS* (кодирующих ферменты, расщепляющие сахарозу), и генов, кодирующих белок CVIF (отвечает за посттрансляционную регуляцию активности инвертазы клеточной стенки) [2]. В то же время результаты, полученные ранее в опытах с прививками и трансплантацией тканей [3], говорят о том, что накопление в стволе транспортной сахарозы является только следствием образования узорчатой древесины, а не ее причиной, поскольку органично сросшиеся ткани карельской березы и березы повислой (или березы пушистой) устойчиво сохраняют свои особенности, хотя и образуют общую проводящую систему, обеспечивающую единый транспортный поток продуктов фотосинтеза [4]. Это согласуется и с мнением Ю. В. Гамалея [5], который указывал, что успешность срастания прививаемых компонентов зависит в большей степени от сходства флоэмных эксудатов, чем от родственных связей растений.

Цель данной работы состояла в проведении молекулярно-генетического исследования (с использованием семи микросателлитных маркеров) тканей древесины и коры, полученных в результате прививки копулировкой и кольцевой (локальной) трансплантации фрагментов коры (как одной из разновидностей прививки) карельской березы на стволы березы повислой.

Материалы и методы исследования. Объектами изучения были карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti) и береза повислая (*Betula pendula* Roth). Материалом для исследований служили ткани древесины и коры, полученные в результате прививки копулировкой и кольцевой (локальной) трансплантации коры (как разновидности прививки), где в качестве привоя (донора) выступала карельская береза, а подвоя (или реципиента) – береза повислая. Выделение ДНК из тканей древесины и коры (18 образцов) осуществляли по методике, описанной ранее [6]. Для генотипирования использовали анализ полиморфизма микросателлитных локусов, локализованных в клеточном ядре (nSSRP). В качестве маркеров применялись полиморфные SSR-локусы, наиболее часто используемые для разных видов березы – L2.2, L1.10, L7.8, L10.1, L022, L7.3, L5.4 [7]. Выбор данных маркеров был также обусловлен их высоким уровнем изменчивости (на основании предварительного анализа показателей полиморфизма: числа аллелей на локус (5–12), наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (0,40–0,90)). Прямой праймер для каждого из маркеров на 5'-конце был мечен одним из типов красителей – 6FAM, TAMRA, HEX.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием коммерческой смеси Fermentas, содержащей TaqHF ДНК-полимеразу согласно инструкции фирмы-изготовителя (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, Литва). Электрофоретическое фракционирование ампликонов SSR-маркеров проводили с помощью генетического анализатора ABI Prism 310 Genetic Analyzer в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Для оценки данных электрофоретического фракционирования, расчета уровня миксоплоидии и определения микросателлитной нестабильности использовали программу GeneMapper 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и их обсуждение. Проведенное исследование показало, что после выполнения прививки путем копулировки и привой, и подвой сохраняли свои генотипические характеристики. При этом электрофоретические спектры древесины, полученные на основе SSR-маркеров, демонстрируют наличие у них одного или двух пиков. Это говорит о том, что как привой, так и подвой являются диплоидами. Однако наличие одного пика свидетельствует, что генотип является гомозиготным по конкретному локусу, а двух – гетерозиготным. В частности, по локусу L1.10 привой (карельская береза) оказался гомозиготным (188 п. н.) (рис. 1, а), а подвой (береза повислая) – гетерозиготным (185/190 п. н.) (рис. 1, б).

В то же время обнаружено, что ткани древесины подвой (березы повислой) имеют некоторые генетические особенности, которые отразились в аллельном дисбалансе, в частности по локусу L2.2, и в значительном количестве минорных фракций с неустановленной детерминацией по

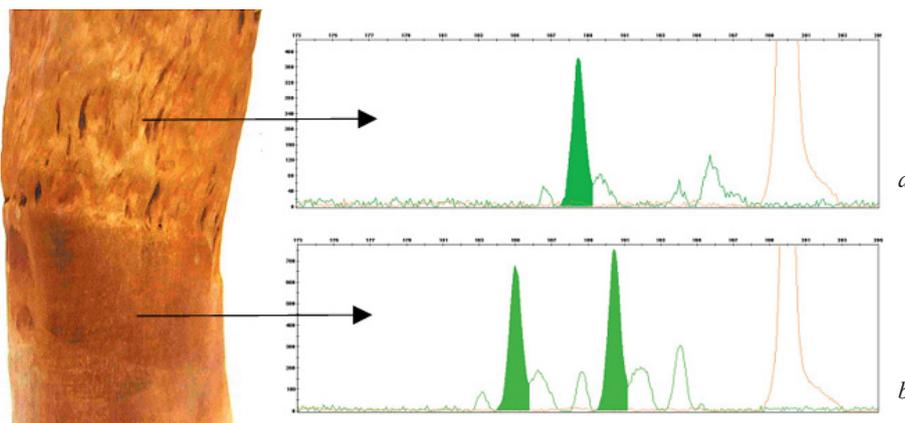


Рис. 1. SSR-спектры по маркеру L1.10 тканей древесины прививки (дерево ПТ-982), выполненной путем копулировки, компонентами которой являются карельская береза – привой (*a*) и береза повислая – подвой (*b*)

Fig. 1. SSR spectra of the marker locus L1.10 of whip-grafted wood tissues (tree PT-982) produced from curly birch as scion (*a*) and silver birch as stock (*b*)

локусу L10.1. Однако генетический химеризм тканей не диагностировался, поскольку характер минорных спектров по локусам L7.3, L10.1, L022 был сходным с подвоем или привоем, а по L2.2, L1.10, L5.4 и L7.8 они не выявлялись.

Молекулярно-генетический анализ компонентов древесины и коры, сформированных в результате кольцевой (в виде пояса) трансплантации тканей коры донора (карельская береза) (рис. 2, *a*), когда были «перерезаны» транспортные пути как нисходящего тока от кроны реципиента (береза повислая) к его собственной корневой системе, так и восходящего (от корневой системы к кроне), показал, что в процессе регенерации тканей участвовали и донор, и реципиент. Однако зона влияния каждого из них была строго локализована [7]. Так, все ткани реципиента (внутреннее кольцо древесины, сформированное до начала трансплантации; сектор, вновь образованный в области соединения (стыка) краевых поверхностей тканей реципиента и донора; а также ниже места кольцевой пересадки) независимо от их типа (кора или древесина) оказались генетически идентичными по плоидности и основному спектру аллелей по изученным локусам. Ткани коры и древесины донора также оказались диплоидными и генетически идентичными по

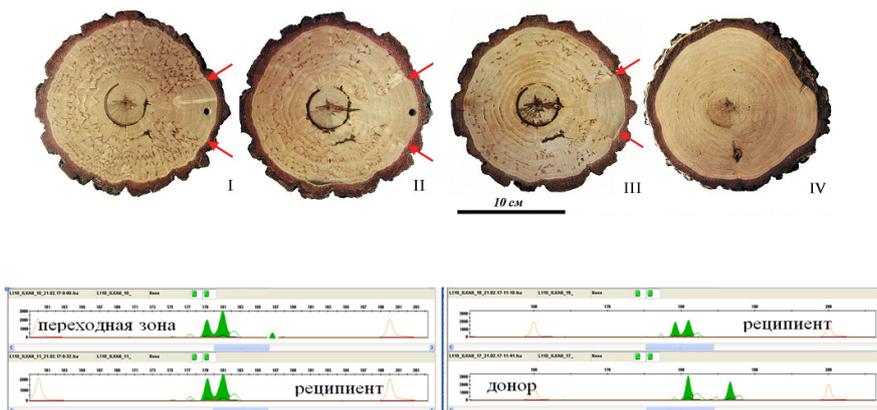


Рис. 2. Поперечные спилы участка ствола после кольцевой пересадки (в виде пояса), сделанные послойно, отражающие изменение текстуры древесины, начиная со средней части (I–III) места трансплантации коры донора (карельской березы) и по мере удаления ее в сторону реципиента (березы повислой) (IV). Стрелками указаны краевые точки соединения древесины донора и реципиента, образовавшейся (в виде сектора) по мере увеличения диаметра ствола (*a*), и отдельные SSR-спектры по маркеру L1.10 (*b*)

Fig. 2. Wood texture in layer-by-layer sections across the middle part (I) of the donor (curly birch) transplant and its alteration (II, III) towards the wood of the recipient (IV) (silver birch). Arrows point to the ends of the union between donor wood and recipient wood formed (as a sector) as the trunk diameter increased (*a*) and to individual L1.10 marker SSR spectra (*b*)

составу аллелей, но заметно отличались от реципиента, при этом узорчатая текстура, характерная для карельской березы, хорошо контрастировала с обычной (прямоволокнистой) древесиной березы повислой после их срастания.

Наряду с этим, в пограничных зонах срастания краевых тканей разных генотипов выявлен генетический химеризм, который проявлялся наличием сходных аллелей (генотипов), присутствующих обоим компонентам. Среди генетических особенностей реципиента также можно отметить микросателлитную нестабильность, которая проявлялась в тканях исходной древесины, образованной в центре ствола, в виде дополнительных атипичных (с редуцированным мотивом в составе повторяющейся ДНК) аллеломорфов в SSR-спектрах.

Анализ уровня миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модального) тканей донора и реципиента (рис. 3) показал, что в ряде случаев данный показатель превышает норму (3–20 %), установленную для соматических клеток покрытосеменных древесных растений [8]. При этом доля гетероплоидных клеток в тканях древесины и коры в «зоне срастания» компонентов на поперечном сечении варьировала от средних до высоких значений (дисбаланс аллелей в различных хромосомах варьировал от 22,2 до 78,6 %), что, возможно, связано с утратой одной из хромосом. Аналогичная ситуация отмечена и для образцов коры реципиента, расположенной в «секторе срастания» генетически разнородных тканей. Возможно, такого рода изменения обусловлены некоторым отставанием процесса восстановления ксилемы (по сравнению с флоэмой) при кольцевой трансплантации по сравнению с тем, как это происходит при классической прививке, когда один из компонентов имеет корневую систему, а другой – побеги, ассимилирующая поверхность которых достаточна для выживания.

Заключение. В целом на основании полученных данных и их анализа установлено, что компоненты прививки, независимо от метода их получения (копулировкой или кольцевой трансплантацией в виде пояса), после срастания сохраняют не только свои фенотипические, но и генотипические особенности. Генетический химеризм диагностировали при кольцевой трансплантации, но исключительно в зонах срастания краевых компонентов донора и реципиента. Это говорит о том, что механизм распознавания генотипов скорее всего включается до начала функционирования вновь образованной сосудистой системы. Полученные результаты являются важными для понимания природы формирования и наследования узорчатой текстуры древесины, которая характерна для карельской березы и по сути является ее важнейшей отличительной чертой.

Благодарности. Анализ данных выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00096), экспериментальные исследования – при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б17-63).

Acknowledgements. The data analysis was funded from the Russian Science Foundation (project no. 22-16-00096), and experimental studies were supported from Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project no. Б17-63).

Список использованных источников

1. Disruption of long-distance transport leads to changes in gene expression profiles of sugar transporters in silver birch / Y. L. Moshchenskaya [et al.] // Russian Journal of Plant Physiology. – 2024. – Vol. 71. – Art. 72. <https://doi.org/10.1134/S1021443724604944>
2. Participation of *CWINV* and *SUS* genes in sucrose utilization in the disruption of cambium derivatives differentiation of silver birch / Y. L. Moshchenskaya [et al.] // Protein & Peptide Letters. – 2024. – Vol. 31, N 6. – P. 479–489. <https://doi.org/10.2174/0109298665309207240621094227>
3. Ермаков, В. И. Внутри- и межвидовая трансплантация коры березы и ее регенерация при повреждении / В. И. Ермаков, Л. Л. Новицкая, Л. В. Ветчинникова. – Петрозаводск, 1991. – 184 с.
4. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза: важнейшие результаты и перспективы исследований / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов. – Петрозаводск, 2021. – 243 с.

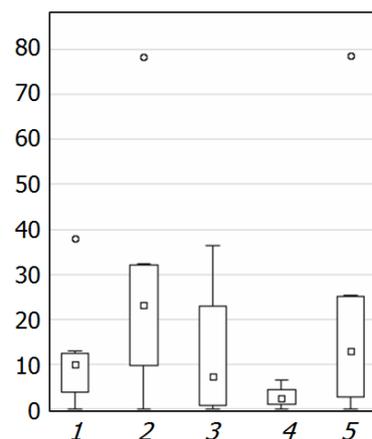


Рис. 3. Уровень миксоплоидии тканей на основании расчета данных потери гетерозиготности по маркерам у донора (карельская береза, КБ-135): 1 – L.1.10, 2 – L.5.4, 3 – L.7.3 и у реципиента (береза повислая, ББ-234): 4 – L.1.10 и 5 – L.7.8

Fig. 3. Tissue mixoploidy calculated from the loss of marker heterozygosity in the donor (curly birch, КБ-135): 1 – L.1.10, 2 – L.5.4, 3 – L.7.3 and in the recipient (silver birch, ББ-234): 4 – L.1.10 and 5 – L.7.8

5. Гамалей, Ю. В. Транспортная система сосудистых растений: происхождение, структура, функции, развитие, анализ разнообразия типов по таксономическим и эколого-географическим группам растений, эволюция и экологическая специализация транспортной системы / Ю. В. Гамалей. – СПб., 2004. – 424 с.

6. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск, 2007. – 176 с.

7. Kulju, K. K. M. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) / K. K. M. Kulju, M. Pekkinen, S. Varvio // *Molecular Ecology Notes*. – 2004. – Vol. 4, N 3. – P. 471–473. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00704.x>

8. Машкина, О. С. Длительное культивирование в условиях *in vitro* как один из способов сохранения представителей ценного генофонда карельской березы / О. С. Машкина, Т. М. Табацкая // *Достижения и проблемы лесной генетики и селекции: к 40-летию НИИЛГиС*. – Воронеж, 2010. – С. 30–51.

References

1. Moshchenskaya Y. L., Galibina N. A., Tarelkina T. V., Nikerova K. M., Serkova A. A., Korzhenevskiy M. A., Klimova A. V., Sofronova I. N., Semenova L. I. Disruption of long-distance transport leads to changes in gene expression profiles of sugar transporters in silver birch. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2024, vol. 71, art. 72. <https://doi.org/10.1134/s1021443724604944>

2. Moshchenskaya Y. L., Galibina N. A., Serkova A. A., Tarelkina T. V., Nikerova K. M., Korzhenevskiy M. A., Sofronova I. N., Semenova L. I. Participation of *CWINV* and *SUS* genes in sucrose utilization in the disruption of cambium derivatives differentiation of silver birch. *Protein & Peptide Letters*, 2024, vol. 31, no. 6, p. 479–489. <https://doi.org/10.2174/0109298665309207240621094227>

3. Ermakov V. I., Novitskaya L. L., Vetchinnikova L. V. *Intra- and interspecific transplantation of birch bark it's regeneration when damages*. Petrozavodsk, 1991. 184 p. (in Russian).

4. Vetchinnikova L. V., Titov A. F. *Curly birch: the most important research results and prospects*. Petrozavodsk, 2021. 243 p. (in Russian).

5. Gamalei Yu. V. *Transport system of vascular plants: origin, structure, functions, development, analysis of type diversity along the taxonomical and eco-geographical groups of plants, evolution and ecological specialization of transport system*. Saint-Petersburg, 2004. 424 p. (in Russian).

6. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk, 2007. 176 p. (in Russian).

7. Kulju K. K. M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae). *Molecular Ecology Notes*, 2004, vol. 4, no. 3, pp. 471–473. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00704.x>

8. Mashkina O. S., Tabatskaya T. M. Long-term cultivation *in vitro* as one of the ways to preserve representatives of the valuable gene pool of Curly birch. *Dostizheniya i problemy lesnoi genetiki i seleksii: k 40-letiyu NIILGiS* [Achievements and problems of forest genetics and breeding: to the 40th anniversary of NIILGiS]. Voronezh, 2010, pp. 30–51 (in Russian).

Информация об авторах

Пантелеев Станислав Викторович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: stasikdesu@mail.ru. ORCID: 0009-0007-6010-8186.

Ветчинникова Лидия Васильевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт леса Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ул. Пушкинская, 11, 185910, Петрозаводск, Российская Федерация). E-mail: vetchin@krc.karelia.ru. ORCID: 0000-0003-2091-905X.

Титов Александр Федорович – член-корреспондент РАН, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, руководитель лаборатории. Институт биологии Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ул. Пушкинская, 11, 185910, Петрозаводск, Российская Федерация). E-mail: titov@krc.karelia.ru. ORCID: 0000-0001-6880-2411.

Кирьянов Павел Сергеевич – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: PKirjanov@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-6224-9771.

Баранов Олег Юрьевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, академик-секретарь. Национальная академия наук Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0665-0093.

Information about the authors

Panteleev Stanislav V. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: stasikdesu@mail.ru. ORCID: 0009-0007-6010-8186.

Vetchinnikova Lidiya V. – D. Sc. (Biology), Professor, Chief Researcher. Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (11, Pushkinskaya Str., 185910, Petrozavodsk, Russian Federation). E-mail: vetchin@krc.karelia.ru. ORCID: 0000-0003-2091-905X.

Titov Alexander F. – Corresponding Member of the RAS, D. Sc. (Biology), Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory. Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (11, Pushkinskaya Str., 185910, Petrozavodsk, Russian Federation). E-mail: titov@krc.karelia.ru. ORCID: 0000-0001-6880-2411.

Kiryanov Pavel S. – Researcher. Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: PKirjanov@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-6224-9771.

Baranov Oleg Yu. – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Academic-Secretary. National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0665-0093.