

Клональное микроразмножение хозяйственно-ценных форм тополя

Е. А. Шабанова – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, научный сотрудник – Воронежский государственный университет, аспирант

О. С. Машкина – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, зав. лабораторией биотехнологии, кандидат биологических наук – Воронежский государственный университет, доцент, vniilgisbiotech@mail.ru

В статье представлены результаты введения в культуру in vitro быстрорастущих форм тополя путем активации развития пазушных меристем. Рассматриваются оптимальные сроки изоляции эксплантов, способы их стерилизации. Приводятся сведения о влиянии солевого и гормонального состава питательной среды на инициацию, элонгацию и укоренение микропобегов.

Ключевые слова: культура ткани, тополь, эксплант, питательная среда, регуляторы роста

В настоящее время наряду с традиционными методами воспроизводства древесных растений широко применяют методы биотехнологии, в частности клональное микро-размножение – массовое вегетативное размножение растений в асептических условиях на искусственных питательных средах.

Тополь – одна из быстрорастущих пород, применяющихся в плантационном выращивании для различных целей. Многими зарубежными и отечественными биотехнологами разработаны способы клонального микро-размножения различных видов гибридов и форм тополя: *P. Alba* L. [1], *P. tremula* L. [2], *P. trichocarpa* [3], *P. balsamifera* L. [4], *P. Canescens* Ait (Sm) [1], *Populus × berolinensis* Dipp. [5] и др. Особенности культивирования *in vitro* видов рода *Populus* подробно освещены в исследованиях [6, 7]. В этих и других работах изучались разные экспланты, способы стерилизации, составы питательных сред, режимы культивирования. Анализ литературных источников по клональному размножению видов рода *Populus* позволил сделать вывод, что для его разных видов, форм и даже генотипов необходимы специфические условия для индукции регенерации побегов, их дорастивания, укоренения и адаптации к почвенным условиям. При работе в культуре тканей *in vitro* с взрослыми деревьями, прошедшими селекционную оценку, нередко возникают трудности, связанные с низкой регенерационной активностью тканей и высоким уровнем зараженности бактериальной и грибной инфекцией. Исследователи отмечают значительную зависимость морфогенетических реакций от особенностей генотипа, возраста, исходного материала, что требует оптимизации условий культивирования и состава питательных сред для работы с конкретными формами, сортами, гибридами [8, 9].

Исследования базируются на опыте сотрудников лаборатории биотехнологии ВНИИЛГИС-биотех по микро-размножению тополей белого, сереющего и осины [1].

Цель настоящей работы – введение в культуру *in vitro* отобранных быстрорастущих форм тополя. В задачи исследования входило опреде-

ление оптимальных сроков изоляции эксплантов, режимов и способов стерилизации растительного материала для получения асептической жизнеспособной культуры и подбор наиболее эффективных условий инициации, развития и укоренения микропобегов для микрочеренкования.

Объекты и методика

Объектами исследования стали 7 перспективных клонов, гибридов и сортов рода *Populus*, отличающихся быстрым ростом, зимостойкостью и засухоустойчивостью:

1. Аллотриплоидный гибрид Э.с.-38 (Воронежский гигант). Получен М. М. Вересиним от скрещивания тополя дельтовидного с тополем бальзамическим [10].

2. Регенерата № 78. Естественный евро-американский гибрид черных тополей, отобран А. П. Царевым [11].

3. Болид. Гибрид Белый × Болле, получен в 1976 г. А. П. Царевым [11].

4. Ведуга. Гибрид Белый × Болле, получен в 1976 г. А. П. Царевым [11].

5. Гибрид № 26.10 – Гибрид Белый × Болле, получен в 1976 г. А. П. Царевым [11].

6. Тополь белый № 143 – отобран А. П. Царевым [10].

7. Степная Лада. Гибрид Дельтовидный № 14 × Пирамидально-осокооревый Камышинский, получен в 1975 г. А.П. Царевым [11].

Стерилизацию эксплантов проводили в 2 этапа:

1) предобработка 2 %-м раствором коммерческого стерилизующего средства «Domestos» в течение 5–15 мин с последующей промывкой в проточной воде не менее 15 мин;

2) основная стерилизация побегов в условиях ламинар-бокса различными стерилизующими агентами (0,025 %-й раствор мертиолята, 7 %-й и 50 %-й раствор дезинфицирующего средства «Белизна», 70 %-й спирт, 3 %-я перекись водорода) с последующей 3-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой.

Культивирование проводили по общепринятой методике при 16-часовом фотопериоде (освещенность 2–3 клк), при температуре 24–26 °С. Пересадку на свежие питательные среды осуществляли каждые 30-35 сут.

Регенерация растений осуществлялась на основе прямой выгонки пазушных побегов, их элонгации и укоренения. Для пролиферации пазушных меристем и элонгации побегов использовались базовые среды MS [12] и WPM [13] с уменьшенным вдвое содержанием макросолей (1/2 MS и 1/2 WPM), дополненные регуляторами роста: 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 0,2–1,0 мг/л, гибберелловая кислота (ГК) 0,2 мг/л. Укоренение проводили как на безгормональных питательных средах, так и на средах, дополненных ауксинами: индолил-3-уксусная кислота (ИУК 0,5 мг/л), индолилмасляная кислота (ИМК 0,01 мг/л). Кроме того, использовали среды, дополненные активированным углем (АУ) в концентрации 1 % и с уменьшенной концентрацией сахара (1 %).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета программ Stadia [14]. Для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Исследование зависимости выхода асептических жизнеспособных культур от сроков изоля-

ции побегов показало, что при использовании летних побегов (май–июнь) выход асептических жизнеспособных культур составил 76,4 %, что достоверно выше ($P < 0,05$) результатов по стерилизации зимних (февраль–март) одревесневших побегов (60,6 %) и согласуется с ранее полученными данными для тополей белого и сереющего [1]. Для зимних побегов единственным удовлетворительным режимом стерилизации из проанализированных стал режим 3, другие использованные стерилизующие агенты положительных результатов не дали. При увеличении времени экспозиции более 15 мин значительно повышалась доля нежизнеспособных культур.

Работа с летними побегами требует более мягкой обработки эксплантов и позволяет получить достаточно большую долю асептических жизнеспособных культур при использовании 50 %-го раствора «Белизны» и 70 %-го спирта (таблица).

Наиболее оптимальным способом для летних побегов является предобработка «Domestos» в течение 7 мин и основная стерилизация смесью растворов мертиолята (0,025 %) и «Белизны» (7 %) 10 мин. Этот режим позволяет получить достаточное количество культур для массового микрклонального размножения тополя.

Помимо времени изоляции побегов и способа стерилизации выход асептических жизнеспособных культур зависел также от индивидуальных особенностей деревьев – генотипа и уровня эндогенной инфекции. Для взрослых деревьев

Эффективность стерилизации первичных эксплантов тополя (летние побеги) в зависимости от способа стерилизации на примере тополя Э.с.-38

Режим	Способ стерилизации			Количество культур, %		
	Предобработка 2 %-м Domestos (t, мин)	Основной стерилизующий агент	t, мин	асептических жизнеспособных	асептических нежизнеспособных	инфицированных
1	5	«Белизна» (7 %) + мертиолят (0,025 %)	10	54,8±2,9	-	45,2±2,9
2	7	«Белизна» (7 %) + мертиолят (0,025 %)	10	82,8±3,6	3,3±3,3	13,9±7,3
3	10	«Белизна» (7 %) + мертиолят (0,025 %)	10	73,3±3,3	20±5,8	6,7±3,3
4	7	«Белизна» (50 %)	5	68,3±8,8	-	31,7±6,0
5	7	Спирт (70 %)	3	53,3±8,9	-	43,3±12,0
6	7	Перекись водорода (3 %)	5	42,2±6,0	-	57,8±8,9

характерен высокий уровень заражения тканей бактериальной и грибной инфекцией. В опыте использовали 40-летние деревья, для которых доля асептических жизнеспособных культур составила от 64,6 % у гибрида Ведуга до 83,3 % у гибрида № 26.10.

Регенерация растений осуществлялась на основе активации развития уже существующих в растении меристем – выгонки пазушных побегов, что обеспечивает сохранение генотипических особенностей исходных деревьев и обеспечивает получение однородного посадочного материала.

Для инициации развития основного побега испытывали среды с уменьшенным содержанием макросолей – 1/2 MS и 1/2 WPM, как без гормонов, так и дополненные регуляторами роста: 6-БАП (0,2–1 мг/л), ГК (0,2 мг/л).

Результаты исследований показали, что при культивировании на питательной среде 1/2 WPM получена более высокая доля морфогенных культур тополя (до 50 % у тополя № 143) по сравнению с культивированием на среде 1/2 MS (до 26,7 % морфогенных культур у тополя Э.с.-38).

Получены положительные результаты при использовании в качестве индуктора побегообразования БАП в концентрациях 0,2 и 0,5 мг/л. На среде 1/2 WPM без гормонов отдельные побеги удалось получить только для тополей № 143 и Э.с.-38, при этом наблюдалось спонтанное укоренение экспланта. Использование БАП в концентрации 1 мг/л, ГК – 0,2 мг/л отдельно и в сочетании с БАП 0,2 мг/л на этапе выгонки первичного побега приводило к гибели сформировавшихся небольших побегов (0,5–1,0 см) уже на 2-й неделе культивирования.

Эффективность побегообразования зависела от генотипа исходного дерева и гормонального состава среды. Так, наибольшей морфогенетической активностью отличались тополя № 143, Болид, Э.с.-38: эффективность побегообразования составила 80, 60 и 50 % соответственно на среде 1/2 WPM + БАП 0,2 мг/л (рис. 1).

Различия проявлялись не только по частоте, но и по характеру морфогенеза. У всех 7-ми изученных форм в течение 30 сут от начала культивирования на первичных эксплантах развива-

лось по одному пазушному побегу размером от 0,5 до 2 см. Однако в целом наблюдался относительно сдержанный рост побегов в высоту. Лучшей ростовой активностью отличались Болид и Степная Лада, на первом месяце культивирования сформировавшие побеги длиной до 1,5–2,0 см, готовые для изоляции и укоренения. У остальных форм максимальная длина побегов достигала 0,9–1,2 см. Такие побеги доращивались (элонгация) в течение 2,0–2,5 мес.

Для элонгации побегов первичные экспланты пересаживали на свежие питательные среды с интервалом 30–35 сут с обновлением нижнего среза стеблевого экспланта на 2–3 мм. Эффективность элонгации зависела от используемых регуляторов роста. Доращивание на средах 1/2 WPM + ГК 0,2 мг/л и 1/2 WPM + БАП 0,2 мг/л + ГК 0,2 мг/л дало результаты только для тополей № 143 и Болид. В остальных случаях культивирование на средах с добавлением ГК способствовало усыханию побегов и гибели эксплантов. Использование БАП в концентрации 0,5 мг/л вызывало появление множества адвентивных побегов, что может привести к соматической изменчивости и нежелательно для получения однородного посадочного материала. Лучшие результаты получены на среде WPM + БАП 0,2 мг/л, что обеспечило прирост побегов до 2 см за один месяц.

Побеги, достигшие 1,5–2,0 см, изолировали и укореняли на питательных средах без гормонов, дополненных ауксинами. Культивирование на безгормональных средах оказалось эффективным только для тополей Э.с.-38 и № 143, причем луч-

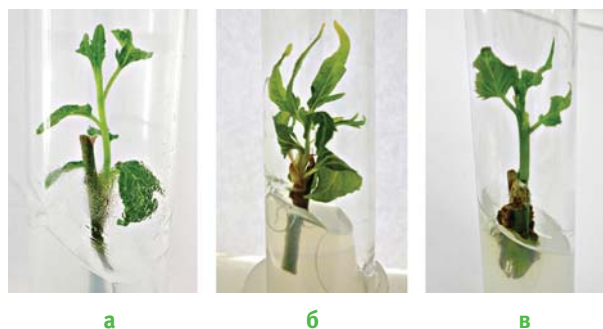


Рис. 1. Развитие основного пазушного побега на среде 1/2 WPM + БАП 0,2 мг/л: а – № 143; б – Болид; в – Э.с.-38

шие показатели спонтанного укоренения наблюдались на средах с содержанием сахарозы (10 г/л): 60 % укорененных побегов для Э.с.-38 (как 1/2 WPM, так и 1/2 MS) и до 50 % для тополя № 143 на среде 1/2 MS. Использование активированного угля в концентрации 1 % позволило укоренить 50 % микропобегов тополя Регенерата и 60 % тополя Ведуга. Использование среды 1/2 WPM+ИУК 0,5 мг/л способствовало укоренению 33,3 % микропобегов тополя Э.с.-38 и 20 % микропобегов тополя Степная Лада, для других форм использование ИУК результатов не дало. Лучшие результаты в среднем для всех форм получены при добавлении в среду в качестве индуктора ризогенеза ИМК 0,01 мг/л: укореняемость составила от 20 до 71,4 %.

Образование корней начиналось на 7–12 сут культивирования. На 30-е сут длина отдельного корня первого порядка составляла 2,5–6,0 см, число корней достигало 5 на одно растение-регенерант (рис. 2).

Для всех исследуемых форм были получены растения-регенеранты, пригодные для массового клонального микроразмножения.

Выводы

Показана возможность получения асептических и жизнеспособных культур *in vitro* для 7 хозяйственно-ценных форм тополя: Э.с.-38, Регенерата, Болид, Ведуга, № 26.10, № 143, Степная Лада.

1. Для тополя определены оптимальные сроки изоляции эксплантов (май–июнь) и режи-

мы стерилизации, позволяющие получить от 64,6 до 83,3 % асептических жизнеспособных культур. Лучшие результаты получены при поэтапной стерилизации 2 %-м «Domestos» в течение 5–7 мин в нестерильных условиях и затем в ламинар-боксе смесью растворов 0,025 %-го мертиолята и 7 %-го дезинфицирующего средства «Белизна».

2. При изучении влияния солевого и гормонального состава питательных сред на формирование и развитие основного пазушного побега выявлено:

✓ Наибольшая эффективность побегообразования (31,9 %) достигнута при использовании среды солевого состава 1/2 WPM.

✓ Высокой морфогенетической активностью отличались тополя № 143, Болид, Э.с.-38, эффективность побегообразования которых на среде 1/2 WPM + БАП 0,2 мг/л составила 80, 60 и 50 % соответственно.

3. При дорастивании индуцированных побегов (размером менее 1 см) эффективным оказалось рекультивирование на среду 1/2 WPM + БАП 0,2 мг/л, что обеспечило прирост побегов до 2 см за месяц.

4. Определены условия укоренения первичных побегов. Спонтанное укоренение наблюдалось у Э.с.-38 (60 % укорененных побегов) и № 143 (до 50 % укорененных побегов) на среде 1/2 MS. Для остальных форм оптимальной является среда 1/2 WPM+ИМК 0,01 мг/л – получено до 71,4 % укорененных микропобегов.

5. Выявлена зависимость всех этапов микроразмножения от генотипа исходного дерева.

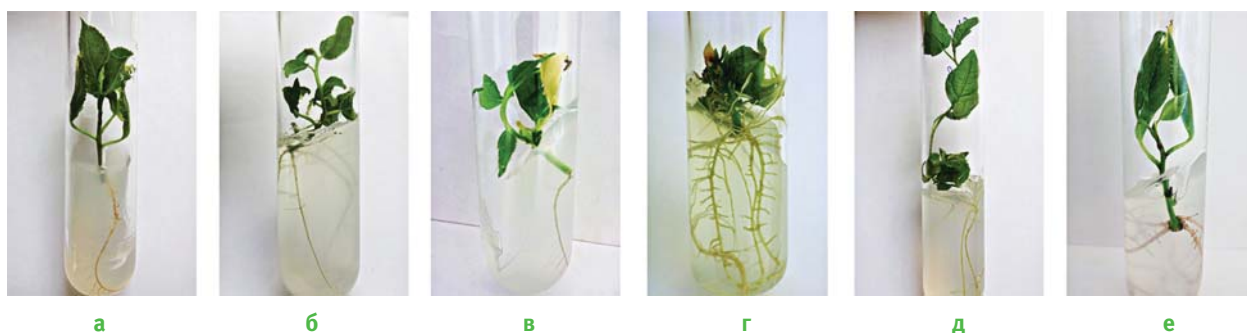


Рис. 2. Укореняемость микропобегов на среде 1/2 WPM+ИМК 0,01 мг/л: а – Э.с.-38; б – Болид; в – Ведуга; г – №26.10; д – №143; е – Степная Лада

Лучшие результаты получены для 2-х форм тополя: Э.с.-38 и № 143.

Заключение

Получены растения-регенеранты 7 перспективных для плантационного выращивания форм

тополя путем прямой регенерации. Определены оптимальные сроки изоляции эксплантов, режимы стерилизации, условия культивирования и состав питательных сред на всех этапах получения растений-регенерантов. Полученные микро-растения пригодны для дальнейшего массового тиражирования с целью получения посадочного материала.

Список литературы

1. Машкина, О. С. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего / О. С. Машкина, Т. М. Табацкая. – Воронеж : НИИЛГиС, 2005. – 29 с.
2. Петрова, Г.А. Использование методов биотехнологии для получения здорового посадочного материала осины (*Populus tremula* L.) в условиях Республики Татарстан : автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук / Г.А. Петрова. – М., 2011. – 23 с.
3. Micropropagation of *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1': the genotype deriving the *Populus* reference genome / K. Byung-guk [at al.] // *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009. – V. 99. – P. 251-257.
4. Микроразмножение видов рода *Populus* / Ю. А. Королева, А. М. Смолин, И. В. Бобошина, Т. Н. Светлакова, С. В. Боронникова // *Вестник Удмуртского ун-та*. – 2012. – Вып. 3. – С. 50–54.
5. Гамбург, К. З. Использование изолированной культуры тополя берлинского (*Populus berolinensis* Dipp.) для его модификации / К. З. Гамбург // *Вестник Иркутской гос. с.-х. академии*. – Ч. 7. – 2011. – Вып. 44. – С. 22–30.
6. Micropropagation, genetic engineering and molecular biology of *Populus* / N. B. Klopfenstein, Y. W. Chun, M.-S. Kim, M. R. Ahuja // *Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station : For. Serv. Gen. Tech. Rep. RM-GTR-297, Fort Collins, CO. – USDA, 1997. – 326 p.*
7. In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement / M. Confalonieri [at al.] // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2003. – V. 72. – P. 109–138.
8. Катаева, Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 95 с.
9. Бутова, Г. П. Клональное микроразмножение лесных древесных растений / Г. П. Бутова // *Лесоводство, лесоведение, лесные пользования : Экспресс-информ.* – М. : ЦБНТИлесхоз, 1987. – Вып. 7. – С. 1–24.
10. Царев, А. П. Сортоведение тополя / А. П. Царев. – Воронеж : изд-во ВГУ, 1985. – 152 с.
11. Царев, А. П. Селекция и репродукция лесных древесных пород : учеб. / А. П. Царев, С. П. Погиба, В. В. Тренин. – М. : Логос, 2001. – 520 с.
12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and boisays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Scoog // *Phisiol. Planetarium.* – 1962. – V.15. – № 3. – P. 473–497.
13. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture / G. Lloyd, D. McCown // *Plant Ptopagators Soc. Comb. Proc.* – 1980. – P. 421–427.
14. Кулаичев, А. П. Методы и средства комплексного анализа данных / А. П. Кулаичев. – М. : ФОРУМ: ИНФРА-М, 2006. – 512 с.

Referens

1. Mashkina, O. S. Rekomendaczii po soxraneniyu i vosproizvodstvu metodami biotexnologii czennyx genotipov karel'skoj berezy, osiny, topolya belogo i sereyushhego / O. S. Mashkina, T. M. Tabaczkaya. – Voronezh : NIILGiS, 2005. – 29 s.
2. Petrova, G.A. Ispol'zovanie metodov biotexnologii dlya polucheniya zdorovogo posadochnogo materiala osiny (*Populus tremula* L.) v usloviyax Respubliki Tatarstan : avtoref. diss. ... kand. s.-x. nauk / G.A. Petrova. – M., 2011. – 23 s.
3. Micropropagation of *Populus trichocarpa* 'Nisqually-1': the genotype deriving the *Populus* reference genome / K. Byung-guk [at al.] // *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009. – V. 99. – P. 251–257.
4. Mikroklonal'noe razmnozhenie vidov roda *Populus* / Yu. A. Koroleva, A. M. Smolin, I. V. Boboshina, T. N. Svetlakova, S. V. Boronnikova // *Vestnik Udmurtskogo un-ta*. – 2012. – Vyp. 3. – S. 50–54.
5. Gamburg, K. Z. Ispol'zovanie izolirovannoj kul'tury topolya berlinskogo (*Populus berolinensis* Dipp.) dlya ego modifikaczii / K. Z. Gamburg // *Vestnik Irkutskoj gos. s.-x. akademii*. – Ch. 7. – 2011. – Vyp. 44. – S. 22–30.
6. Micropropagation, genetic engineering and molecular biology of *Populus* / N. B. Klopfenstein, Y. W. Chun, M.-S. Kim, M. R. Ahuja // *Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station : For. Serv. Gen. Tech. Rep. RM-GTR-297*, Fort Collins, CO.- USDA, 1997. – 326 p.
7. In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement / M. Confalonieri [at al.] // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2003. – V. 72. – P. 109–138.
8. Kataeva, N. V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij / N. V. Kataeva, R.G. Butenko. – M. : Nauka, 1983. – 95 s.
9. Butova, G. P. Klonal'noe mikrorazmnozhenie lesnyx drevesnyx rastenij / G. P. Butova // *Lesovodstvo, lesovedenie, lesnye pol'zovaniya : Ekspress-inform.* – M. : CzBNTIlesxoz, 1987. – Vyp. 7. – S. 1–24.
10. Czarev, A. P. Sortovedenie topolya / A. P. Czarev. – Voronezh : izd-vo VGU, 1985. – 152 s.
11. Czarev, A. P. Selekcziya i reprodukziya lesnyx drevesnyx porod : ucheb. / A. P. Czarev, S. P. Pogiba, V. V. Trenin. – M. : Logos, 2001. – 520 s.
12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and boisays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Scoog // *Phisiol. Planetarium.* – 1962. – V.15. – № 3. – P. 473–497.
13. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture / G. Lloyd, D. McCown // *Plant Ptopagators Soc. Comb. Proc.* – 1980. – P. 421–427.
14. Kulaichev, A. P. Metody i sredstva kompleksnogo analiza dannyx/ A. P. Kulaichev. – M. : FORUM; INFRA-M, 2006. – 512 s.

Micropropagation of economically valuable poplar forms

E. A. Shabanova – Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Researcher Scientists – Voronezh State University, postgraduate

O. S. Mashkina – Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Candidate Biologist, Head of Biotech Laboratory – Voronezh State University, associate professor, vniilgisbiotech@mail.ru

In the process of micropropagation of woody plants morphogenetic reaction considerable depends on genotype, age, source material. These factors require optimization of culture conditions and the composition of culture media for specific forms, varieties, hybrids.

The aim of this study is regenerate in vitro fast-growing and resistant poplars form for plantations and to find the optimal conditions for obtaining aseptic viable cultures and the composition of the culture medium based on genotypic characteristics of trees.

Poplar micropropagation was performed by activation of axillary meristems. Using the young shoots, isolated in May and June lets to get more aseptic viable cultures (76.4 %) compared with winter woody shoots (60.6 %). The most effective method of explant sterilization is preprocessing means 2 % solution of «Domestos» for 7 minutes and the basic sterilization by solution mixture of 0.02 % thimerosal and «Belizna» 7 % for 10 min.

The results showed that the highest percentage of morphogenic cultures was obtained using 1/2 WPM medium, containing BAP 0.2 mg/l. For elongation the shoots are transplanted to fresh medium every 30–35 days.

The shoots 1.5–2 cm long were rooted in the hormone-free media and with the addition of auxin. The maximum rooting (71.4 %) was achieved using IBA 0.01 mg/l as root inducer. The efficiency of all stages of micropropagation is significantly depends on the genotype of the source tree. For all test forms were obtained regenerated plants useful for mass micropropagation.

Keywords: *tissue culture, poplar, explant, culture medium, growth regulators*