

УДК 581.143.6

*Ю.А. Королева, А.М. Смолин, И.В. Бобошина, Т.Н. Светлакова, С.В. Боронникова***МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА *POPULUS***

Рассмотрено состояние вопроса в области селекции видов рода *Populus* в Пермском крае. Изложены результаты эксперимента по получению здоровых эксплантов осины и тополя методом клонального микроразмножения. Описана модификация технологии культуры ткани *in vitro* применительно к древесным видам.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, *Populus tremula* L., *Populus balsamifera* L.

Огромна и универсальна роль леса в жизни человека. Большую роль играет лес в развитии лесопромышленного комплекса. Непрерывно возрастает спрос на главный продукт леса – древесину, в связи с этим принимаются меры по подъему продуктивности насаждений и сокращению сроков выращивания лесов. Одним из наиболее радикальных методов решения этой проблемы является широкое внедрение в состав наших лесов быстрорастущих и хозяйственно-ценных видов [1]. Среди них одно из первых мест принадлежит видам рода тополь (*Populus*), которые отличаются быстротой роста и скороспелостью. Тополя применяются в защитном лесоразведении, в том числе на орошаемых землях, где они, обладая сильным ростом, быстро создают защитный эффект. Все это придает видам рода *Populus* первостепенное значение и требует большего внимания к их селекции, разведению и выращиванию в нашей стране [2].

Интенсивные рубки высокопродуктивных устойчивых форм в XIX и начале XX века, а также вспышки инфекционных болезней привели к значительному обеднению генофонда и широкому распространению повреждения древесины, наличию сучков и гнили осины. Селекционно-ценных осиников осталось мало, поэтому важным является отбор в природе, а также искусственное получение высокопродуктивных и устойчивых форм и гибридов, их сохранение и воспроизводство [1]. Технология культуры ткани *in vitro* ускоряет процесс селекции и позволяет в короткие сроки размножить ценные генотипы [3]. Использование достижений генетики и селекции в практике лесного хозяйства позволяет в полной мере использовать большие потенциальные возможности генетических ресурсов для сохранения и приумножения лесных богатств [4].

Цель данной работы – модификация методики микроклонального размножения и определение ростовой активности эксплантов на примере двух видов рода *Populus*.

Материалы и методика исследований

Опыты по введению в культуру *in vitro* видов рода *Populus* проводились на кафедре ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. Экспериментальная работа частично была выполнена в лаборатории микроклонального размножения на кафедре физиологии растений Пермской государственной сельскохозяйственной академии им. Д.Н. Прянишникова.

Модификация методики была использована для лиственных древесных видов растений [5]. Материалом для микроклонального размножения служили черенки двух видов растений: тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) и тополь дрожащий, или осина (*Populus tremula* L.). В роли доноров растительного материала использовались селектированные по фенотипу деревья приблизительно одного возраста из естественных популяций тополей, произрастающих на территории Пермского края. Нами была модифицирована методика микроклонального размножения, описанная Е.А. Калашниковой и А.Р. Родиным [6]. В качестве экспланта мы использовали пазушные почки размером 0,5-1,0 см, а так же использовали зеленые верхушки, находящиеся в стадии активного роста, с 3-5 распустившимися листочками, пророщенные из побегов в стадии покоя.

Проводились следующие этапы введения в культуру *P. balsamifera*: с побегов растений срезали проросшие из почек зеленые верхушки длиной 0,5-1,5 см, не повреждая точку роста. Материал сначала промывали в проточной воде 2 часа, а затем при постоянном помешивании 20 мин в теплой воде с детергентом Твин-20.

Наша модификация методики микроклонального размножения заключалась в процедуре двой-

ной стерилизации проросших верхушек. Этот этап работы проводится в стерильных условиях. Проросшие верхушки помещали на 8 мин в стерилизующий раствор сулемы, затем стерилизовали 2-3%-м гипохлоритом кальция 10-12 мин. Верхушки необходимо промывать стерильной водой 5 раз.

Стерилизация растительного материала происходила с применением раствора гипохлорита натрия (2-3%) и сулемы (0,1%). Стерилизация почек осуществлялась с применением этилового спирта. Перед стерилизацией использовалась предварительная промывка с применением поверхностно-активных веществ (Твин-20), а после – 5-кратная промывка стерильной водой. В качестве исходной использовалась среда следующего состава: микро- и макроэлементы по Мурасиге-Скугу, органический состав-тиамина гидрохлорид (0,5 мг/л), пиридоксина гидрохлорид (0,5 мг/л), никотиновая кислота (1,0 мг/л), аскорбиновая кислота (1,0 мг/л), фолиевая кислота (0,5 мг/л), пантотеновая кислота (0,5 мг/л), глицин (аминоуксусная кислота) (2 мг/л), мезоинозит (100 мг/л), сахароза (30 г/л), агар (7 г/л), 6 БАП (6-бензиламинопурин) (2 мг/л). Для выращивания древесных растений мы добавили в питательную среду сахарозу, фитогормоны, минеральные элементы: фосфор, калий, кальций, железо; витамины. Стерилизацию среды проводили автоклавированием (режим P=1 атм, T=121°C, 20 мин).

Культуральные сосуды размещались на стеллажах с продольным расположением люминесцентных ламп. Освещённость поддерживалась на уровне 3,0 КЛк (источник света – люминесцентные лампы белого цвета 35 Вт). Температура $21 \pm 2^{\circ}$ С. Активность роста определяли в баллах, при этом учитывалась высота прироста и эффективность листообразования [5]. Статистическую обработку результатов производили с использованием приложения Microsoft Excel, а также проводили фотосъёмку эксплантов.

Результаты и их обсуждение

В результате разработанной нами модификации методики микроклонального размножения для листовых древесных видов растений было установлено, что двойная стерилизация проросших верхушек приводит к выращиванию здоровых эксплантов. Наблюдается незначительный бактериальный брак.

Лучшие результаты наблюдались на среде с 2 мг/л 6 БАП. Очень высокая, высокая и средняя ростовая активность эксплантов *P. balsamifera* была отмечена в 98 % пробирок.

64 проросшие верхушки *P. balsamifera* были посажены в пробирки. После бракеража жизнеспособные экспланты находились в 51 пробирке. Таким образом, выход жизнеспособных эксплантов составил 80 %.

Стерилизация эксплантов и 4 недели их выращивания (к 1 пассажу) привели к увеличению числа листьев. Новообразование листьев составило в среднем на 1 растение 2,0 (то есть образовалось почти 2 новых листочка). Отмечен рост верхушек *P. balsamifera*, их средняя высота составила 11,9 мм (рис. 1). Высота до 5 мм наблюдалась у 9 эксплантов, от 6 до 10 мм – у 8 эксплантов, более 10 мм – у 34 эксплантов. У большинства эксплантов наблюдался значительный прирост.



Рис. 1. Рост верхушечной меристемы *P. balsamifera*

Очень высокая активность роста верхушек побегов *in vitro* наблюдалась у 2,0% всех эксплантов, высокая активность роста – 23,5%. Средняя интенсивность роста отмечена у 41,1%. Таким образом, более чем у половины эксплантов *P. balsamifera* наблюдалась высокая или средняя интенсивность роста. Слабый рост наблюдался у 7,8 % эксплантов, очень слабый у 19,6% и у 5,9% эксплантов роста не отмечено. Большая часть эксплантов *P. balsamifera* отличается высокой или средней активностью роста (рис. 2).



Рис. 2. Различная ростовая активность верхушечной меристемы *P. balsamifera*

У 15,7% эксплантов наблюдалось активное листообразование с появлением 4 листьев. У остальных эксплантов образование новых листьев шло медленно. Субкультивирование эксплантов проводили через месяц, высадив 55 эксплантов. Питательная среда для субкультивирования была той же, что и для введения в культуру. После бракеража жизнеспособные экспланты находились в 44 пробирках. Таким образом, выход жизнеспособных эксплантов *P. balsamifera* составил 80,0 %, а 4 недели их выращивания привели к выявлению 37 здоровых эксплантов, что составило 84,1%.

В течение четырех недель выращивания у эксплантов шло массовое образование почек и побегов (табл.).

Ростовая активность побегов *P. balsamifera*

Ростовая активность побегов	Количество побегов	Количество эксплантов (%)
Высокая	более 6	56,8
Средняя	4 – 6	24,3
Низкая	0 – 3	18,9

Таким образом, у большинства эксплантов (56,8 %) наблюдалась высокая интенсивность роста, с массовым образованием побегов и почек.

Модифицированная методика микроклонального размножения была апробирована на *P. tremula*. В качестве основного экспланта у этого вида, также как и *P. balsamifera*, использовали зеленые верхушки, находящиеся в стадии активного роста, с 3-5 распустившимися листочками, пророщенными из побегов в стадии покоя. Условия стерилизации, которые являлись благоприятными для эксплантов *P. balsamifera*, не были эффективными для эксплантов *P. tremula*. После смягчения условий (сокращение времени нахождения эксплантов в растворе сулемы 5 мин, в растворе гипохлорита кальция 8 мин) у эксплантов *P. tremula* наблюдался прирост и активное листообразование, и не наблюдалось бактериального и физиологического брака. К сожалению, разработанная для *P. balsamifera* модификация методики микроклонального размножения оказалась неприемлема для выращивания эксплантов *P. tremula*.

Проросшие верхушки *P. tremula* были посажены в 50 пробирок. Бактериального и грибного заражения не было обнаружено, но выявлен физиологический брак. После бракеража жизнеспособные экспланты находились в 28 пробирках. Таким образом, выход жизнеспособных эксплантов составил 56,0%. Стерилизация эксплантов и 4 недели их выращивания (к 1 пересадке) привели к увеличению числа листьев. Новообразование листьев составило в среднем на 1 растение 2,7 (то есть образовалось почти 3 новых листа). Отмечен рост верхушек тополя дрожащего, их средняя высота составила 9,8 мм (рис. 3). Высота до 5 мм наблюдалась у 4 эксплантов, от 6 до 10 мм – у 13 эксплантов; более

10 мм – у 11 эксплантов. Таким образом, у большинства эксплантов *P. tremula* наблюдается значительный прирост.



Рис. 3. Рост верхушечной меристемы *P. tremula*

Очень высокая активность роста верхушек побегов *P. tremula in vitro* наблюдалась у 3,6% всех эксплантов. Высокая активность роста у 10,7%. Средняя интенсивность роста у 53,6%, то есть более чем у половины эксплантов наблюдалась средняя интенсивность роста. Слабый рост наблюдался у 25,0% эксплантов, очень слабый у 7,1%.

Итак, у 21,4% эксплантов было выявлено активное листообразование с появлением 4 и 5 листьев. У остальных эксплантов (78,6%) образование новых листьев шло более медленными темпами.

Выводы

Таким образом, новообразование листьев более активно происходило у эксплантов *P. tremula*, так как в среднем образовалось 3 новых листа, по сравнению с процессом листообразования у *P. balsamifera*, у которого отмечено в среднем новообразование 2 листьев. Прирост побегов больше у *P. balsamifera* (12,0 мм) по сравнению с данным показателем у *P. tremula* (9,8 мм). У *P. balsamifera* большинство эксплантов (56,8%) высотой более 10 мм, у *P. tremula* большинство эксплантов (46,4%) высотой от 6 до 10 мм. У *P. balsamifera* преобладает высокая и средняя интенсивность роста эксплантов, а у *P. tremula* – средняя и слабая. Бактериальному заражению больше подвержены экспланты *P. balsamifera*, но и выход жизнеспособных эксплантов у данного вида больше, так как экспланты *P. tremula* подверглись физиологическому браку. Листообразование с появлением 4 или 5 листьев лучше выражено у эксплантов *P. tremula* (21,4%) по сравнению с подобным процессом у *P. balsamifera* (15,7%).

Таким образом, *P. balsamifera* обладает более интенсивным ростом, чем *P. tremula*. Между тем, у *P. tremula* отмечено более активное листообразование.

Работа выполнена в рамках государственного задания на оказание услуг, финансируемых Министерству образования и науки РФ из средств федерального бюджета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машкина О.С., Исаков Ю.Н. Микроклональное размножение хозяйственно ценных генотипов осины // Сохранение, изучение и воспроизводство генетических ресурсов лесных древесных растений: сб. науч. тр. Воронеж, 2007. С.47-57.
2. Иванников С.П. Тополь. М.: Лесная промышленность, 1980. 85 с.
3. Лебедев В.Г., Булатова И.В., Шадрин Т.Е. и др. Применение методов биотехнологии для повышения продуктивности лесных культур // Лесохозяйственная информация. 2008. № 3-4. С. 28-29.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев, 1992. 232 с.
5. Смолин А.М., Боронникова С.В., Королёва Ю.А. Микроклональное размножение лиственных видов деревьев для плантационного выращивания с целью сохранения естественных лесов // Тез. докл. междунар. совещания по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири. URL: http://www.ict.nsc.ru/ws/show_abstract.dhtml?ru+207+15653
6. Калашникова Е.А., Родин А.Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии. М: МГУЛ, 2001. 122 с.

Yu.A. Koroleva, A.M. Smolin, I.V. Boboshina, T.N. Svetlakova, S.V. Boronnikova

Clonal microreproduction of kinds of sort *Populus*

The article deals with the selection of kinds of sort *Populus* in the Perm region. The results of the experiment on the reception of healthy explants of an aspen and a poplar by the method of clonal microreproduction are stated. The modification of technology of tissue culture *in vitro* with reference to wood kinds is described.

Keywords: clonal microreproduction, *Populus tremula* L., *Populus balsamifera* L., modification.

Королева Юлия Алексеевна, студентка

E-mail: polovinka13@mail.ru

Бобошина Ирина Викторовна, аспирантка

E-mail: coccinela@yandex.ru

Светлакова Татьяна Николаевна, аспирантка

E-mail: atea2@yandex.ru

Боронникова Светлана Витальевна,

доктор биологических наук, профессор

E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru

ФГБОУВПО «Пермский государственный
национальный исследовательский университет»
614990, Россия, г. Пермь, ул. Букирева, 15 (корп. 1)

Смолин Алексей Михайлович,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

ФГБОУВПО «Пермская государственная
сельскохозяйственная академия

им. ак. Д.Н. Прянишникова»

614000, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23

E-mail: samdrev@yandex.ru

Koroleva Yu.A., student

E-mail: polovinka13@mail.ru.

Boboshina I.V., postgraduate student

E-mail: coccinela@yandex.ru.

Svetlakova T.N., postgraduate student

Boronnikova S.V., doctor of biological science, professor
Perm State National Research University

614990, Russia, Perm, Bukireva st., 15

E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru.

Smolin A.M., candidate of agricultural science,
associate professor

Perm State agricultural academy

614000, Russia, Perm, Petropavlovskaya st., 23

E-mail: samdrev@yandex.ru