

УДК 631.532/.535

UDC 631.532/.535

**ОЦЕНКА СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ И МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ POPULUS TREMULA L. В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

**ASSESSMENT METHOD OF STERILIZATION AND MINERAL COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIUM ON EFFICIENT CULTIVATION OF POPULUS TREMULA L. IN TISSUE CULTURE**

Зонтиков Дмитрий Николаевич  
к.с.-х.н.

Zontikov Dmitriy Nikolaevich  
Cand.Agr.Sci.

Зонтикова Светлана Анатольевна  
к.с.-х.н.  
*Костромской государственный университет им. Некрасова, Кострома, Россия*

Zontikova Svetlana Anatolyevna  
Cand.Agr.Sci.  
*Nekrasov Kostroma State University, Kostroma, Russia*

Сергеев Роман Владимирович  
к.с.-х.н.

Sergeyev Roman Vladimirovich  
Cand.Agr.Sci.

Новиков Петр Сергеевич  
аспирант

Novikov Petr Sergeevich  
postgraduate student

Шургин Алексей Иванович  
к.с.-х.н., доцент  
*Поволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия*

Shurgin Alexey Ivanovich  
Cand.Agr.Sci., associate professor  
*Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russia*

Проведено сравнение количественной и качественной производительности отобранных клонов селекции А.С. Яблокова и С.Н. Багаева. В одних и тех же лесорастительных условиях клоны значительно превышают обычные по запасам, абсолютным полнотам, средним высотам и диаметрам насаждений. Исполинские формы *P. tremula L.* резистентны к гнилевым болезням, и в пятом классе возраста характеризуются хорошим санитарным состоянием. Показана хозяйственная целесообразность использования быстрорастущих клонов в генетическом резервате исполинской осины при организации плантационного выращивания *P. tremula L.*

A comparison of quantitative and qualitative performance of the selected clones of breeding of A.S. Yablokov and S.N. Bagaev has been made. At the same forest conditions, the clones are much higher than regular at reserves, the absolute completeness, the average heights and diameters of trees. Gigantic forms of *P. tremula L.* are resistant to infectious diseases, and at the fifth grade are characterized by good sanitary condition. We have also shown the economic feasibility of using of fast-growing clones in the genetic reserve for the organization of giant aspen of *P. tremula L.* plantation

Ключевые слова: POPULUS TREMULA L., КЛОН, ИСПОЛИНСКАЯ ФОРМА, САНИТАРНОЕ СОСТОЯНИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ РЕЗЕРВАТ

Keywords: POPULUS TREMULA L., CLONE, GIGANTIC FORM, SANITARY CONDITION, GENETIC RESERVE

Большое значение при создании плантаций осины, имеет качество посадочного материала. Её использование ограничивается поражением грибом *Phellinus tremulae* Bond. et Boris, который вызывает разрушение древесины. Решение данной проблемы возможно при выращивании осины с триплоидным набором хромосом ( $2n=38$ ,  $3n=57$ ). Одной из проблем получения посадочного материала осины триплоидной является

невозможность получения от неё семян. Единственным способом размножения при этом становится вегетативное, обеспечивающее сохранение хозяйственно ценных свойств, в тоже время микроклональное размножение обеспечивает не только сохранение полезных качеств исходного генотипа, но и оздоравливание его от всех типов инфекций, в том числе вирусных, а также позволяет существенно увеличить интенсивность лесовосстановительных работ.

Осина относится к видам, которые успешно размножаются вегетативным способом, однако для повышения экономической эффективности и получения высококачественного посадочного материала *Populus tremula* L. необходимо использовать метод клонального микроразмножения. В России данную технологию размножения осины используют в Санкт-Петербургском НИИ лесного хозяйства, Воронежском НИИ лесной генетики и селекции, Филиале института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и др.. Используя метод клонального микроразмножения триплоидной осины, возможно, получать древесину, не поражённую грибом *Phellinus tremulae* Bond. et Boris, уже через 30 лет.

Технология клонального микроразмножения осины в культуре *in vitro* на сегодняшний день достаточно хорошо отработана, однако требует дополнительной доработки отдельных этапов, для снижения себестоимости получаемого посадочного материала.

Метод инициации геммогенеза на донорных эксплантах осины весьма разнообразны. В настоящее время используются несколько различных подходов, отличающихся разными типами используемых регуляторов роста и их концентрациями.

Эффективность каллусогенеза, геммогенеза и их скорость, сильно зависят как от генотипических особенностей, так и от условий инициации.

В качестве донорных эксплантов использовали метамеры молодых побегов, изолированные от маточных растений *Populus tremula* L. Побеги изолировали из средней части кроны. В исследованиях использовали деревья клона №35 и диплоидные контрольные растения.

Цитологические исследования проводили по методике [7].

Исследования в условиях *in vitro* проводили в соответствии с методическими указаниями по культуре ткани и органов в селекции растений [2].

Для разработки эффективного способа получения стерильных морфогенных эксплантов *Populus tremula* L. были исследованы следующие режимы стерилизации: водный раствор гипохлорита натрия в концентрации 2 % с экспозициями 10, 15 и 20 минут; пероксид водорода 6 % с экспозициями 10, 15 и 20 минут. Перед тем как поместить растительные образцы в стерилизующий раствор их промывали в 70 % этаноле в течение 1 минуты, а после стерилизации трехкратно промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 15 минут. Простерилизованные экспланты помещали на питательную среду и культивировали при температуре 18-20 °С.

Большое значение на морфогенез растения оказывает способ стерилизации донорного экспланта [6]. Наиболее распространенными стерилизующими агентами в настоящее время являются: гипохлориты кальция и натрия, входящие в состав различных коммерческих отбеливателей, пероксид водорода.

В результате проведения исследования установлено, что увеличение концентрации гипохлорита натрия увеличивает выход стерильных морфогенных эксплантов, а наиболее эффективный режим стерилизации при использовании 2,5 % гипохлорита натрия в качестве стерилизующего агента (рис. 1), при этом число стерильных морфогенных эксплантов

составило 23,2 %. Увеличение концентрации NaClO более 2,5 % приводит к гибели не только патогенных организмов, но и клеток самого экспланта.

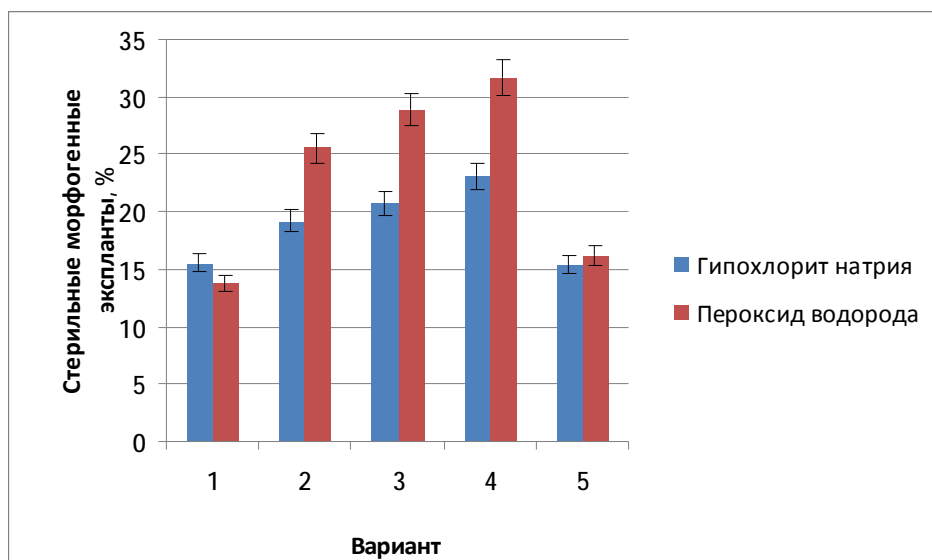


Рисунок 1 – Число асептических морфогенных эксплантов *Populus tremula* L. в зависимости от способа стерилизации

Аналогичным образом при увеличении концентрации перекиси водорода в промежутке с 5 % до 6,5 % увеличивается выход стельных морфогенных эксплантов. При этом максимальное значение последних составляет 31,7 %, дальнейшее увеличение концентрации негативно сказывается на качестве эксплантов (табл. 1). Таким образом по результатам проведения исследования можно сделать вывод, что наиболее эффективным способом стерилизации эксплантов *Populus tremula* L. является перекись водорода в концентрации 6,5 %.

Таблица 1 – Влияние на инфицированность донорных эксплантов осины различных стерилизующих агентов, при экспозиции 10 минут

Стерилизующий агент	Концентрация стерил. агента, %	Получено эксплантов							
		стерильных				инфицированных			
		не морфогенных		морфогенных		бактериями		грибами	
		шт.	%±Sp	шт.	%±Sp	шт.	%±Sp	шт.	%±Sp
Гипохлорит натрия	1,0 (конт)	6	10,3±1,0	9	15,5±1,4	28	48,2±2,7	15	25,8±1,4
	1,5	7	12,9±0,7	10	19,2±1,0	23	42,5±1,0	12	22,2±0,9
	2,0	12	23,1±0,9	11	20,5±0,4	20	38,4±0,9	10	19,2±0,9
	2,5	<b>15</b>	<b>29,4±1,3</b>	<b>12</b>	<b>23,2±0,7</b>	15	29,4±1,8	10	19,6±0,7
	3,0	23	44,2±3,8	8	15,3±0,7	12	23,0±1,0	9	17,3±1,0
Пероксид водорода	5,0 (конт)	7	12±1,1	8	13,7±1,3	26	44,8±2,5	17	29,3±2,0
	5,5	5	10,6±1,0	12	25,5±1,2	20	42,5±3,2	10	21,2±2,0
	6,0	7	15,5±1,2	13	23,8±1,6	19	42,2±3,1	6	13,3±0,9
	<b>6,5</b>	<b>8</b>	<b>19,5±0,9</b>	<b>13</b>	<b>31,7±2,2</b>	15	36,5±2,5	5	12,1±0,6
	7,0	15	40,5±2,3	6	16,2±1,2	11	29,7±2,1	5	13,5±0,8

Необходимо отметить, что на стерильность донорных эксплантов осины сильно влияет время года, в которое ведутся работы. Для *Populus tremula* L. наиболее благоприятным периодом получения донорных эксплантов считается промежуток с середины мая до первой декады июля, в другое время стерильные морфогенные экспланты получить очень проблематично (рис 2).

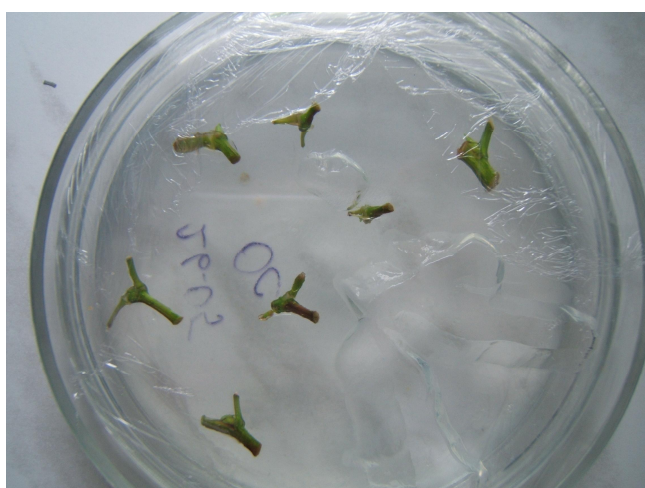


Рисунок 2 – Стерильные морфогенные донорные экспланты триплоидной осины клона №35

Эффективность морфогенеза во многом зависит от типа донорного экспланта. В качестве источника эксплантов могут быть использованы ткани, взятые из многих органов растения. Известны работы, в которых регенерация была индуцирована в тканях незрелых зародышей [3], в культуре почек [4], из листовых дисков [5], из семядольных листьев и гипокотильных сегментов стерильных проростков [1].

Для повышения эффективности введения в культуру *in vitro* была проведена оценка различных типов донорных эксплантов. Для регенерации осины применялись экспланты двух типов - апикальный и латеральный метамер, различного срока изоляции (апрель, май, июнь, июль, август).

В результате опыта наибольшей регенерационной активностью обладали апикальные метамеры. Наибольшей регенерационной активностью обладал клон № 35. Апикальные метамеры обладали большей энергией роста, большей жизнеспособностью (табл. 2).

Таблица 2 – Морфогенез осины в зависимости от генотипа и типа экспланта

Клон №	Тип экспланта	Всего эксплантов, шт.	Число растений-регенерантов	
			шт.	%±Sp
30	Апикальный метамер	175	7	<b>4,0±0,4</b>
	Латеральный метамер	116	2	1,7±0,4
35	Апикальный метамер	101	6	<b>5,9±0,3</b>
	Латеральный метамер	107	2	1,9±0,7
27	Апикальный метамер	112	5	<b>4,5±0,2</b>
	Латеральный метамер	178	7	3,9±0,4



Рисунок 3 – *Populus tremula* L. клон №35

Одним из определяющих факторов оказывающих существенное влияние на рост и развитие эксплантов в культуре *in vitro* является минеральный состав питательной среды.

В практике культивирования растительных тканей в условиях *in vitro* применяется достаточно большое количество базовых сред MS [14], DKW [10], GD [11], WPM [13] и др., а также их различные модификации АЗ [12], Sh-2 [15], MSm, ACM [9] и др. предложенные исследователями для размножения конкретных видов и сортов растений (табл. 3).

Таблица 3 – Состав некоторых питательных сред, используемых при культивировании растений *in vitro*.

Компонент (mg/L)	DKW/Juglans	Woody plant medium	McCown's woody plant	Murashige and Skoog	Murashige and Skoog 1/2	Schenk and Hildebrandt
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1416,0	400,0	400,0	1650,0	825	-
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	300,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,8	6,2	6,2	6,2	3,1	5,0
CaCl <sub>2</sub>	112,5	96,0	72,5	332,2	166,1	151,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1367,0	556,0	386,0	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,025	0,0125	0,1
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,025	0,0125	0,2

Компонент (mg/L)	DKW/Juglans	Woody plant medium	McCown's woody plant	Murashige and Skoog	Murashige and Skoog 1/2	Schenk and Hildebrandt
Na <sub>2</sub> -EDTA	45,4	37,3	37,3	37,26	18,63	20,0
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	33,8	27,8	27,8	27,8	13,9	15,0
MgSO <sub>4</sub>	361,49	370,0	180,7	180,7	90,35	195,4
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	33,5	22,3	22,3	16,9	8,45	10,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,39	0,25	0,25	0,25	0,125	0,1
NiSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,005	-	-	-	-	-
KJ	-	-	-	0,83	0,415	1,0
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	1900,0	950	2500,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	265,0	170,0	170,0	170,0	85	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1559,0	990,0	990,0	-	-	-
ZnNO <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	17,0	-	-	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	-	8,6	8,6	8,6	4,3	1,0

Оценку влияния различных видов питательных сред на морфогенез осины проводили с использованием питательных сред: McWP, 1/2MS и WPM. Среды были дополнены регуляторами роста БАП в концентрации 0,5 мг/л, аденин 20 мг/л, гиббереловая кислота 0,1 мг/л.

В результате исследования была выделена среда McWP, на которой было получено у клона № 27 – 13,0 % побегов, клона № 30 – 16,4 % побегов, клона № 35 – 12,6 % побегов, (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние различных видов питательных сред на морфогенез осины (число донорных эксплантов n = 500)

Питательная среда	№ клона	Число побегов		Число каллусов	
		шт.	%±Sp	шт.	%±Sp
McWP	27	65	13,0±1,6	13	2,6±0,7
	30	82	16,4±3	14	2,8±0,7
	35	63	12,6±1,6	12	2,4±0,7
½ MS	27	3	6±0,3	1	2±0,2
	30	11	2,2±0,7	2	4±0,3
	35	5	1,0±0,4	0	0
WPM	27	7	1,4±0,5	2	4±0,3
	30	1	2±0,2	3	6±0,3
	35	9	1,8±0,6	4	9±0,4

Питательные среды McWP и WPM очень близки по своему компонентному составу, различаются только содержанием таких макроэлементов как CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, однако



это оказало эффект на рост и развитие растений *Populus* в культуре *in vitro*. Поэтому необходимо дальнейшее изучение влияния макроэлементов на морфогенез осины триплоидной (*Populus tremula* L.).

*Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Государственный контракт №14.518.11.7055 от 20.07.2012 г.) на базе Биотехнологического комплекса по воспроизводству высших растений в условиях «чистой комнаты».*

#### Список литературы

1. Белоногова М.А. Генетическая трансформация льна-долгунца с использованием семядольных эксплантов /Автореферат дис...к.б.н. – М., 2006. –24 с.
2. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей как метод изучения процессов роста и морфогенеза растений. /Р.Г. Бутенко - М.: Наука. - 1964. –256 с.
3. Гапоненко А.К., Воронина И.П., Белецкий Ю.Д. Эффективность трансформации незрелых зародышей подсолнечника //Новые методы биотехнологии растений. Материалы симпозиума. – Пушино, 1991. – 223 с. – с.13-14.
4. Ивашута С.И., Мазин В.В., Солодкая Л.А. Генетическая трансформация культуры клевера лугового //Новые методы биотехнологии растений. Материалы симпозиума. – Пушино, 1991. – 223 с. – с.18-19.
5. Картель Н.А., Курочкина С.Д., Забенькова К.И. Трансгенные растения картофеля, полученные кокультивацией листовых дисков с агробактериями //Новые методы биотехнологии растений. Материалы симпозиума. – Пушино, 1991. – 223 с. – с.20.
6. Поляков, А.В. Получение регенерантов овощных культур и их размножение *in vitro*. Методические рекомендации. /А.В. Поляков – М.: ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии, 2005. – 36 с.
7. Пухальский, В.А. Цитология и цитогенетика растений /В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, В.Н. Юрцев. М.: - Издат-во МСХА, 2004. 118 с.
8. Русин Н.С. Рекомендации по выращиванию быстрорастущих форм (клонов) тополя и осины для промышленного использования. Методические рекомендации./ Н.С. Русин, О.С. Машкина, Т.А. Табацкая – Воронеж: ФГУП НИИЛГиС, 2010. – 38 с.
9. Ahuja, M.R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen / M.R. Ahuja // *Silvae Genetica*. – 1983. – Vol. 32. – P. 131 – 135.
10. Driver, J. A. In vitro propagation of paradox walnut rootstock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // *Hortscience*. – 1984. – Vol. 19. – P. 507 – 509.
11. Gresshoff, P. M. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) / P. M. Gresshoff, C. H. Doy // *Planta*. – 1972. – Vol. 107. – P. 161 – 170.
12. Karkonen, A. Micropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes / A. Karkonen // *Societas Biologica Fennica*. – 1999. – Vol. 36. – P. 21 – 31.
13. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. H. McCown // *Proceeded International Plant Propagators Society* – 1980. – Vol. 30. – P. 421 – 427.
14. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.

15. Schenk, R. U. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures / R. U. Schenk, A. C. Hildebrandt // *Canadian Journal Botánica*. – 1972. – Vol. 50. – P. 199 – 204.

### References

1. Belonogova M.A. Geneticheskaja transformacija l'na-dolgunca s ispol'zovaniem semjadol'nyh jeksplantov /Avtoreferat dis....k.b.n. – M., 2006. –24 s.
2. Butenko, R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej kak metod izuchenija processov rosta i morfogeneza rastenij. /R.G. Butenko - M.: Nauka. - 1964. –256 s.
3. Gaponenko A.K., Voronina I.P., Beleckij Ju.D. Jeffektivnost' transformacii nezrelyh zarodyshej podsolnechnika //Novye metody biotehnologii rastenij. Materialy simpoziuma. – Pushhino, 1991. – 223 s. – s.13-14.
4. Ivashuta S.I., Mazin V.V., Solodkaja L.A. Geneticheskaja transformacija kul'tury klevera lugovogo //Novye metody biotehnologii rastenij. Materialy simpoziuma. – Pushhino, 1991. – 223 s. – s.18-19.
5. Kartel' N.A., Kurochkina S.D., Zaben'kova K.I. Transgennye rastenija kartofelja, poluchennye kokul'tivaciej listovyh diskov s agrobakterijami //Novye metody biotehnologii rastenij. Materialy simpoziuma. – Pushhino, 1991. – 223 s. – s.20.
6. Poljakov, A.V. Poluchenie regenerantov ovoshhnyh kul'tur i ih razmnozhenie in vitro. Metodicheskie rekomendacii. /A.V. Poljakov – M.: GNU VNIIO Rossel'hoz akademii, 2005. – 36 s.
7. Puhalskij, V.A. Citologija i citogenetika rastenij /V.A. Puhalskij, A.A. Solov'ev, V.N. Jurcev. M.: - Izdat-vo MSHA, 2004. 118 s.
8. Rusin N.S. Rekomendacii po vyrashhivaniju bystrorastushhih form (klonov) topolja i osiny dlja promyshlennogo ispol'zovanija. Metodicheskie rekomendacii./ N.S. Rusin, O.S. Mashkina, T.A. Tabackaja – Voronezh: FGUP NIILGiS, 2010. – 38 s.
9. Ahuja, M.R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen / M.R. Ahuja // *Silvae Genetica*. – 1983. – Vol. 32. – P. 131 – 135.
10. Driver, J. A. In vitro propagation of paradox walnut rootstock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // *Hortscience*. – 1984. – Vol. 19. – P. 507 – 509.
11. Gresshoff, P. M. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) / P. M. Gresshoff, C. H. Doy // *Planta*. – 1972. – Vol. 107. – P. 161 – 170.
12. Karkonen, A. Micropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes / A. Karkonen // *Societas Biologica Fennica*. – 1999. – Vol. 36. – P. 21 – 31.
13. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. H. McCown // *Proceeded International Plant Propagators Society* – 1980. – Vol. 30. – P. 421 – 427.
14. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T.Murashige, F.Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.
15. Schenk, R. U. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures / R. U. Schenk, A. C. Hildebrandt // *Canadian Journal Botánica*. – 1972. – Vol. 50. – P. 199 – 204.