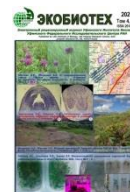




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И ТРИПЛОИДНОЙ ОСИНЫ *IN VITRO*

Анохина Н.С.*, Коновалов В.Ф., Ханова Э.Р.

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

*E-mail: anokhina.ns@yandex.ru

Предложены методические аспекты микроклонального размножения ценных древесных видов – триплоидной осины и карельской березы, имеющих важное значение для обогащения генофонда основных лесообразующих древесных видов в республике и получения высококачественного древесного сырья в виде поделочной и декоративной древесины.

Ключевые слова: клональное микроразмножение ♦ культура *in vitro* ♦ осина ♦ карельская береза ♦ питательная среда

MICROCLONAL PROPAGATION OF KARELIAN BIRCH AND TRIPLOID ASPEN *IN VITRO*

Anokhina N.S.*, Konovalov V.F., Khanova E.R.

Bashkir state agrarian university, Ufa, Russia

*E-mail: anokhina.ns@yandex.ru

Methodological aspects of microclonal reproduction of valuable tree species – triploid aspen and Karelian birch, which are important for enriching the gene pool of the main forest-forming tree species in the Republic and obtaining high-quality wood raw materials in the form of ornamental and decorative wood, are proposed.

Keywords: clonal micropropagation ♦ *in vitro* culture ♦ aspen ♦ karelian birch ♦ nutrient medium

Поступила в редакцию: 15.06.2021

[DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-2-101-106](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-2-101-106)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений развития науки в области биотехнологий в лесном хозяйстве является микроклональное размножение ценных древесных видов к числу которых относятся естественный полиплоид триплоидная осина и карельская береза.

Триплоидная осина обладает высокой устойчивостью к грибным заболеваниям и древесной продуктивностью. Древесина карельской березы отличается высокой декоративностью и имеет важное значение в производстве декоративных изделий. Ценные свойства и качества отмеченных древесных видов наиболее полно передаются в потомстве при их вегетативном выращивании, особенно при микроклональном размножении отобранных растений-эксплантов. Основными преимуществами микроклонального размножения растений, по сравнению с вегетативным, являются следующие: высокий коэффициент размножения, независимость от сезонности выполняемых работ, возможность размножать наиболее ценные растения с высоким уровнем наследования хозяйственно-ценных признаков и свойств в потомстве, выращивание трудно размножаемых видов растений общепринятыми способами. В последние годы наметилась тенденция расширения научных исследований по данной проблеме, однако в условиях республики они практически являются пионерными.

В литературе представлены малочисленные научные работы по микроклональному размножению некоторых хвойных древесных видов [Юшкова и др., 2001; Лебедев, Шестибратов, 2012; Ворошилова, Третьякова, 2013; Третьякова и др., 2015, 2019; Третьякова, Пак, 2018; Tret'yakova et al., 2019].

Работы по микроклональному размножению лиственных древесных видов, в том числе осины и карельской березы, также единичны [Газизуллин и др., 2011; Бабикова и др., 2013; Ветчинникова и др., 2014].

Отмечено, что метод микроклонального размножения, основанный на культивировании изолированных клеток, тканей и органов древесных растений на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* позволяет получать посадочный материал независимо от урожая и качества семенного материала, а также наиболее полно сохранять ценные признаки и свойства материнских растений, с которых заготавливается исходный материал.

Цель нашего исследования введение в культуру *in vitro* с использованием метода микроклонального размножения триплоидной осины и карельской березы, а также подбор оптимальных условий для адаптации микроклонов к нестерильной среде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работы с культурой клеток *in vitro* проводились в биотехнологической лаборатории Башкирского государственного аграрного университета. Объектом исследования служили микроклоны триплоидной осины *Populus tremula* L. LAT-47 и карельской березы *Betula pendula* var. *carelica* Кб76, приобретенные в ООО НПП «Микроклон» г. Пущино, Московская область. Микрочеренки инокулировали на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1978], дополненная БАП в концентрации 0.5 мг/л по рекомендации [Машкина и др., 2011]. Именно такая концентрация регулятора роста способствовала формированию побегов, отличающихся хорошим ростом в высоту. Слишком низкое содержание БАП в среде было недостаточным для развития первичных побегов, а слишком высокое – подавляло развитие эксплантов и рост побегов в высоту [Машкина и др., 2011]. После появления пазушных побегов микрочеренки, переносили на среду для укоренения, в качестве которой использовали среду МС, дополненную ИМК в концентрации 0.5 мг/л.



Рис. 1 Высаженные на питательную среду микрочеренки березы карельской.

Стерильные побеги разрезали в асептических условиях (в ламинар-боксе) на сегменты величиной 1.5-2.0 см с 2-3 пазушными почками и высаживали на питательные среды

в культуральные сосуды (стеклянные биологические пробирки, колбы, банки, пластиковые контейнеры) (рис. 1). Затем помещали их на светоплощадку с 16-ти часовым фотопериодом при интенсивности освещения 3-4 тысяч люкс и температуре 23-24°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате культивирования микрочеренков формировались пазушные побеги (рис. 2), которые по достижению ими высоты 2–3 см, пересаживали на среду для укоренения. Более крупные побеги перед посадкой разрезали на микрочеренки размером 2–3 см с 2-3 пазушными почками.



Рис. 2. Укорененные растения: а – карельской березы, б – триплоидной осины.

Эффективность укоренения микропобегов *in vitro* была высокой и составила 94% у триплоидной осины и 86% у карельской березы.

Мультипликация микрорастений проводилась раз в 2 месяца на питательной среде МС с добавлением ИМК. Для этого микрочеренки длиной 1.5-2 см, содержащие 1-2 пазушные почки, помещали по 10-15 штук в один пластиковый контейнер (емкостью до 250 мл) (рис. 3).

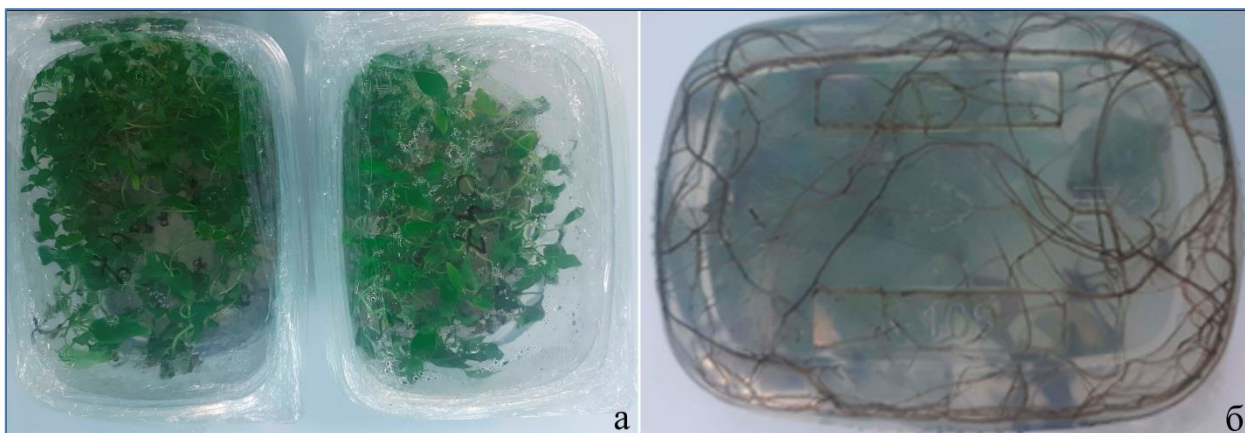


Рис. 3. Размноженный *in vitro* посадочный материал осины триплоидной:
а – укорененные микрорастения в контейнерах с питательной средой;
б – корневая система микрорастений (вид снизу).

При получении посадочного материала методом культуры *in vitro* наиболее ответственным и сложным является процесс адаптации и перевод микрорастений в нестерильные условия. Это объясняется тем, что в условиях *in vitro* влажность воздуха близка к насыщающей, отсутствует градиент водного потенциала между испаряющей поверхностью листа и атмосферой, снижается транспирация из-за дефицита CO₂, у растений появляются нефункционирующие устьица, снижается осмотическое давление, происходит обезвоживание корней на агаре и нарушение водного баланса. Это приводит к тому, что у растений *in vitro* формируется специфический культуральный фенотип, который носит приспособительный характер и отличается от обычных растений анатомическими и физиологическими характеристиками. [Гигалошвили и др., 1997].

Укоренившиеся растения высаживали в почвенный субстрат на адаптацию и доращивались в условиях лаборатории. Почвенный субстрат состоял из садовой земли, торфа и перлита в соотношении 1:1:1. Растения высаживались в пластиковые контейнеры по 6-8 шт и сверху накрывались прозрачными крышками для предотвращения потерь влаги в начальный период. К моменту высадки в почвенный субстрат высота растений триплоидной осины составляла 5±1.2 см, у карельской березы 4±1.5 см. Контейнеры с растениями размещались в лаборатории где поддерживался режим освещения 16/8 день/ночь при интенсивности освещения 3-4 тысячи люкс и температуре 23-24°C. Показатели адаптации растений отражены в таблице.

Таблица. Показатели адаптации саженцев триплоидной осины и карельской березы

Показатели	Триплоидная осина Клон LAT-47	Карельская береза Клон К646
Количество микрорастений <i>in vitro</i>	50	50
Количество растений с закрытой корневой системой	3	27
Средняя высота растений через месяц после высадки, см	7.0±1.3	6.0±1.2
Сохранность в лабораторных условиях, %	6	54

Процесс адаптации у карельской березы проходил достаточно легко, в лабораторных условиях сохранность была на уровне 54% (табл.). У триплоидной осины адаптация шла тяжело. Растения осины при высадке в почвенный субстрат обрабатывались раствором глицерина и воды в соотношении 1:1 для снижения потерь влаги, однако это не дало ощутимого результата и растения быстро теряли тургор и увядали. Из 50 высаженных в почвенный субстрат растений выжили только 3. Таким образом, сохранность триплоидной осины в лабораторных условиях составила 6%.

Все адаптированные растения доращивали в лабораторных условиях для дальнейшей высадки в открытый грунт (рис. 4).

Таким образом, показана принципиальная возможность массового тиражирования ценных пород лиственных деревьев на основе микроклонального размножения *in vitro* и подобраны условия для их адаптации к нестерильным условиям.

В настоящее время экспериментальная работа продолжается. Она заключается в подборе технологических параметров микроклонального размножения опытных растений,

адаптации к почвенно-субстратной среде, выращиванию посадочного материала с закрытой корневой системой, для его последующей высадки в открытый грунт с целью изучения приживаемости и сохранности полученных саженцев в условиях Республики Башкортостан.



Рис. 4. Доращивание саженцев карельской березы в лабораторных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Газизуллин А.Х., Пуряев А.С., Гарипов Н.Р. Эффективный способ выращивания «быстрого», высокопродуктивного леса в Республике Татарстан на примере осины (*Populus trïmula L.*) // Биотехнология: состояние и перспективы развития – материалы VI Московского международного конгресса, часть I. Москва, 2011. Ч.1. С. 281–282.
2. Гигаловшили Т.С., Родькин О.И., Реуцкий В.Г. Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. М., 1997. С.413.
3. Ветчинникова Л.В. Титов А.Ф., Кузнецов Т.Ю. Опыт создания коллекции ценных представителей семейства *Betulaceae L.*, произрастающих на территории фенноскандии, с помощью клонального микроразмножения/ Л.В.Ветчинникова, // Размножение лесных растений в культуре *in vitro* как основа плантационного лесовыращивания: материалы международной научно-практической конференции. Йошкар-Ола: ПГТУ, 2014. С. 8–13.
4. Ворошилова Е.В. Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез в культуре мегагаметофитов и зиготических зародышей *Pinus sibirica* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы X международ. конф. Казань, 2013. С. 107.
5. Лебедев, В.Г., Шестибратов К.А. Органогенез сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*) в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2012. № 1-2. С. 114–119.
6. Машкина О.С., А.И. Сиволапов, Табацкая Т.М. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии *in vitro* / Воронеж: Воронежская государственная лесотехническая академия, 2011. С. 11–12.
7. Бабилова А.В., Гафицкая И.В., Корень О.Г. Микроклонирование декоративных древесных растений // Проблемы озеленения населенных пунктов: материалы городской научно-практической конференции. Владивосток, 2013. С. 10–14.
8. Третьякова И.Н., Пак М.Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбриогенной культуре *in vitro* // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 4. С. 251–263. DOI: [10.1134/S0475145018010068](https://doi.org/10.1134/S0475145018010068)

9. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С. Микроклональное размножение *Larix sibirica* и *Larix sukaczewii* с использованием биотехнологии соматического эмбриогенеза *in vitro* // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: материалы 4-го междунаро. совещ. Барнаул, 2015. С. 175.
10. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Кулагин Д.В., Константинов А.В., Падутов В.Е. Микроклональное размножение лиственницы сибирской в культуре *in vitro* и соматическая изменчивость // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: тезисы докладов. Казань, 2019. С. 439.
11. Юшкова Е.В., Никонорова Е.В., Величко Н.А. и др. Микроразмножение хвойных в условиях *in vitro* // Лесной журнал. 2001. № 4. С. 129–132.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol Plant*. 1962. V. 15. P. 473–497. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
13. Tretyakova I.N., Park M.E., Oreshkova N.V., Kulagin D.V., Konstantinov A.V., Padutov V.E. Reproduction and genetic accuracy during somatic embryogenesis in *larix sibirica* // *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019*. Novosibirsk, 2019. С. 137-139.