

УДК 57.085.2+633.878.32

РАЗМНОЖЕНИЕ ТОПОЛЯ КОРЕЙСКОГО *in vitro***Т. П. Орехова**Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН
690022, Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159

E-mail: tp.orekhova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.01.2024 г.

Обсуждается запатентованная методика введения в культуру *in vitro* и способ получения регенерантов от молодых побегов плюсового дерева тополя корейского (*Populus koreana* Rehder) мужского генотипа. Для культивирования использовали модифицированные на основе MS и ½ MS среды, дополненные антибиотиком цефатоксимом и гормонами. Активация пазушной меристемы происходила при помощи комбинации гормонов в следующих концентрациях: N⁶-бензиаминопурин (BA) – 0.2 мг/л; тидиазурон (TDZ) – 0.05–0.1 мг/л; нафталаденоцетиновая кислота (NAA) – 0.01 мг/л. Мультипликацию побегов проводили на тех же средах, используя гормоны: (BA) – 0.4–0.6 мг/л и 3-индолил масляную кислоту (IBA) – 0.1 мг/л. Рост побегов происходил под влиянием 0.1 мг/л кинетина, а процесс ризогенеза – при использовании гормонов: IBA – 0.25–0.5 мг/л и кинетина – 0.1 мг/л. Растения укоренялись в стерильном субстрате, состоящем из равных частей песка, вермикулита и лесной почвы. Регенеранты тополя различались по скорости роста, при этом не наблюдали морфологических изменений растений. Одна часть растений отличалась быстрым ростом в высоту, другие растения развивались очень медленно. Наиболее высокие экземпляры отмечены у клонов 1/1, 1/8 и 1/14, их высота варьировала от 18 до 30 см. Сделан вывод, что появление растений с различной скоростью роста – результат проявления соматональной изменчивости вида при его культивировании *in vitro*. Однако это явление требует дальнейшего подтверждения. Полученные данным способом растения не имеют грибных, бактериальных и вирусных инфекций и способны размножаться черенкованием. Предложенная технология в будущем может быть использована в практических целях.

Ключевые слова: *Populus koreana* Rehder, эксплант, среда, гормоны, меристема, побег, каллус, ризогенез.

DOI: 10.15372/SJFS20240406

ВВЕДЕНИЕ

Представителей рода тополь (*Populus* L.) считают одними из самых перспективных видов для плантационного выращивания (Лебедева, Таранов, 2019; Царев и др., 2019а, б; Nelson et al., 2019). Выращиванием тополей на плантациях в настоящее время активно занимаются во многих странах мира (Lasarus et al., 2015; Царев, Царева, 2017). Древесную массу тополей активно используют в качестве биотоплива и сырья при производстве этанола (Vaschetti et al., 2016; Nelson et al., 2018, 2019). Развивается направление по переработке зелени, почек и древесины тополя для получения ценных химических соединений и эндофитных бактерий (Исаева и др., 2016; Аксенов, Кузьмина, 2018; Rubert-Nason, Lindroth, 2021).

В России для различных целей выращивают более 30 видов тополей (Царев и др., 2019а). Тополь считают удобным модельным объектом для генетико-селекционных исследований (Douglas, 2017; Лебедева, Таранов, 2019; Сиволапов А. И., Сиволапов В. А., 2020). Тополя легко скрещиваются, поэтому методы их гибридизации получили очень широкое распространение. Межвидовые гибриды тополя очень часто проявляют гетерозис и дают рекордный ежегодный прирост (Царев и др., 2019а, б). Получение высокопродуктивных гибридов – это очень сложная, длительная селекционная работа, которая может занимать десятилетия (Лебедев, Шестибратов, 2015). Тем не менее российские лесоводы достигли значительных результатов в получении гибридов тополей (Царев, 2019; Сиволапов, 2020; Тараканов и др., 2021).

Наличие небольшого генома у тополя позволило генетикам сократить срок получения новых высокопродуктивных генотипов при помощи искусственной геномной модификации. За рубежом уже получены гибриды тополей, обладающие высокими ростовыми показателями и уменьшенным содержанием в древесине лигнина (Shani et al., 2004; Wang et al., 2013; Van Acker et al., 2014; Лебедев, Шестибратов, 2015). Обзор зарубежных статей по выращиванию модифицированных деревьев (Eriksson et al., 2000; Лебедев, Шестибратов, 2021; Lebedev, Shestibratov, 2021) позволил установить следующее. В настоящее время трудно оценить успешность выращивания модифицированных деревьев без продолжительных полевых испытаний и моделирования этого процесса. Модификация лигнина, выполняющего защитные функции, по мнению авторов, увеличивает риск нарушения устойчивости деревьев к различным стрессовым факторам. Полагают, что эти факторы могут привести не только к снижению продуктивности растений, но, возможно, к их полной гибели (Лебедев, Шестибратов, 2021; Lebedev, Shestibratov, 2021). В настоящее время обсуждается устойчивость тополевых плантаций в условиях изменения климата на планете (Ахужа, 2021).

Наряду с искусственной гибридизацией и модификацией различных видов тополя развивается направление по введению в культуру его естественных гибридов (Климов, Прошкин, 2018; Эрст и др., 2019). Некоторые из них не способны размножаться стеблевыми черенками. Быстрое получение посадочного материала тополей в промышленных масштабах сегодня возможно путем их микроклонального размножения (Лебедев, Шестибратов, 2015).

Большой интерес представляют миксоплоиды и полиплоиды тополя, триплоиды осины (*Populus tremula* L.), обладающие соматическим гетерозисом (Cai, Kang, 2011; Машкина, 2016; Машкина и др., 2019; Царев и др., 2019a). Наибольшую ценность имеют полиплоиды тополя сереющего (*Populus × canescens* (Aiton) Sm.), зарегистрированные как сорта для промышленного разведения (Сиволапов, 2020). Разработана также методика получения мутантов высокопродуктивных генотипов тополя сереющего с использованием метода индуцированного мутагенеза в условиях культуры *in vitro* (Шабунин, Бутенко, 2021).

Экспериментально установлено, что соматическая изменчивость растений при их выращивании *in vitro* может иметь как отрица-

тельные, так и положительные эффекты (Лебедев и др., 2012). Соматическая изменчивость представляет собой спонтанный мутагенез, возникающий в культуре тканей растений при их выращивании *in vitro*. Изменчивость отдельных видов древесных растений уже рассматривалась в ряде работ (Константинов, Пантелеев, 2014; Петрова, Калашникова, 2014). Эксперименты по размножению *in vitro* пирамидального тополя (*Populus nigra* var. *italica* Münchh.) показали возможность получения, отбора и размножения его быстрорастущих клонов (Gamburg, Voinikov, 2013).

На Дальнем Востоке России род тополь представлен 9 видами (Сосудистые растения..., 1995). Тополь корейский (*Populus koreana* Rehder) относится к секции *Tacamahaca* Spach (бальзамические тополя) и растет в поймах рек. Высота дерева может достигать 30–35 м, а диаметр ствола 1.5 м и более. Деревья этого вида отличаются интенсивным ростом, в природе встречаются как мужские, так и женские особи (Сосудистые растения..., 1995). Как наиболее перспективный вид для плантационного выращивания (Алексеев, Никитенко, 2017; Орехова, 2019) он был выбран для экспериментальных работ по размножению *in vitro*.

Цель исследований – разработать методику клонального микроклонального размножения *in vitro* для тополя корейского, позволяющую получить максимальный выход жизнеспособных регенерантов, различающихся интенсивностью роста. Основные задачи исследования: разработать методику стерилизации эксплантов; подобрать состав сред и гормонов для активации пазушной меристемы листа, мультипликации и роста побегов; установить оптимальный состав среды и концентрацию гормонов для ризогенеза побегов; разработать методику адаптации регенерантов к почвенным условиям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для экспериментов по размножению *in vitro* было выбрано мужское дерево тополя корейского. В первой декаде марта с дерева были нарезаны только удлиненные побеги 60–70 см с множеством почек. Ветки поместили в сосуды с водой для получения зеленых побегов в лабораторных условиях. В качестве эксплантов использовали части молодого зеленого побега длиной от 1.5–2.0 см. Число эксплантов в экспериментах варьировало от 50 до 100 шт. (рис. 1, а).

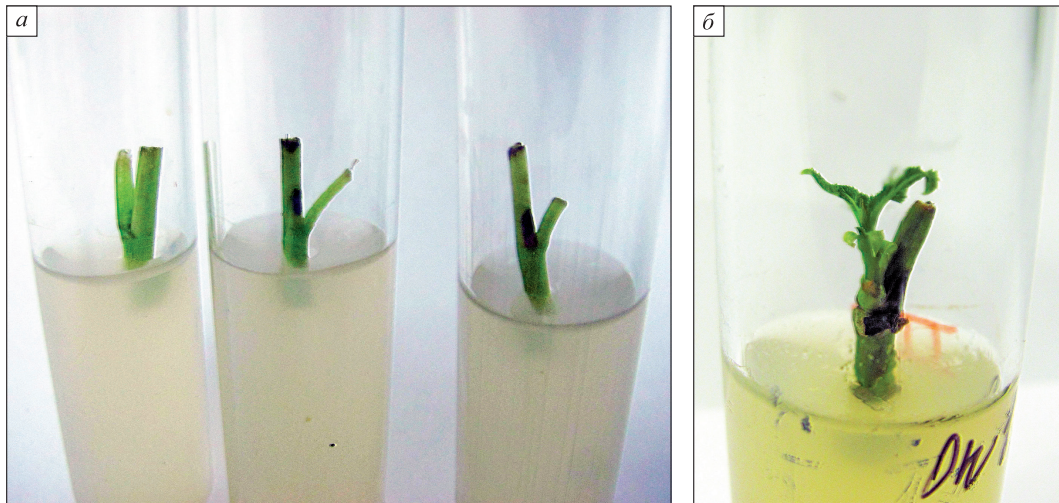


Рис. 1. Экспланты тополя корейского на среде $\frac{1}{2}$ MS (а) и рост побега из пазушной меристемы листа под действием гормонов (0.2 мг/л BA; 0.1 мг/л TDZ; 0.01 мг/л NAA) (б).

Древесные породы, растущие в муссонном климате Дальнего Востока, имеют высокую зараженность вирусными заболеваниями. Установлено также, что ткани древесины разных видов тополя содержат большое количество бактериальных эндофитов (Аксенов, Кузьмина, 2018), потому была разработана многоступенчатая методика стерилизации эксплантов тополя. Обработка осуществлялась следующим образом: в течение 30 мин растительный материал промывали сначала под струей водопроводной воды и пены от хозяйственного мыла; затем его помещали на 20 мин в 0.1%-й раствор Твин-80; в последующем материал 5 раз промывали дистиллированной водой, затем в течение 30 мин стерилизовали в 20%-м растворе Domestos, содержащим гипохлорид натрия, с последующим пятикратным промыванием в дистиллированной воде.

Основную стерилизацию проводили в ламинарном боксе (Lamsystems, Россия). Растительный материал первоначально обрабатывали в течение 1–2 мин раствором 70%-го этилового спирта и пятикратно промывали в стерильной воде. Потом экспланты стерилизовали продолжительностью 2–5 мин (в зависимости от их толщины) в 0.2%-м растворе диацида (растворы солей этанолртути хлорида и цетилпиридиния хлорида). После обработки диацидом, растительный материал пятикратно промывали в стерильной воде и помещали на 30 мин в 0.7%-й раствор антибиотика цефотаксима. В процессе стерилизации колбу с эксплантами помещали в шейкер (100 оборотов/6 мин) для лучшего проникновения в ткани дезинфицирующих растворов.

Согласно литературным данным, наиболее оптимальными для выращивания эксплантов тополя являются среды MS и $\frac{1}{2}$ MS (с половинным содержанием макросолей) (Gamburg, Voinikov, 2013; Машкина, 2016). В качестве субстрата для активации пазушной меристемы и последующего побегообразования использовали базовые среды MS и $\frac{1}{2}$ MS (Murashige, Skoog, 1962), в которые были введены дополнительные компоненты и гормоны (табл. 1). Автоклавирование среды проводили при температуре 120 °С в течение 20 мин. Среда имела pH 5.8. Растворенные в стерильной воде витамины, гормоны добавляли в ламинарном боксе в охлажденную среду, пропуская их через стерильный мембранный фильтр (0.20 мкмоль, Hyundai Micro Co., Korea), последним вносили в среду раствор антибиотика.

После стерилизации экспланты вертикально погружали в среду, разлитую в стеклянные пробирки объемом 25 мл на глубину 0.2 см (рис. 1, а). Среда для активации пазушной меристемы листа состояли из компонентов, приведенных в табл. 1, а также использовали гормоны: тидиазурон в концентрации 0.05–0.1 мг/л (TDZ), 0.2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-BA) и нафтолаленацетиновую кислоту (NAA) в концентрации 0.01 мг/л. В экспериментах применяли разные среды и разные концентрации гормонов.

Экспланты культивировали при температуре 25 °С и 16-часовом освещении люминесцентными лампами (OSRAM L 36W/765 (Russia/Poland)). Очередной пассаж растений на каждом этапе культивирования проводили через каждые 15–20 дней на тех же средах и при тех же условиях. В процессе культивирования на конце экспланта, погруженного в среду, образовывался

Таблица 1. Состав среды для культивирования тополя корейского *in vitro*

Компоненты, мг/л	Индукция пазушной меристемы и побегообразования	Мультипликация побегов	Рост и удлинение побегов	Образование корней
<i>½ MS макросоли</i>				
NH ₄ NO ₃	825	825	825	825
KNO ₃	950	950	950	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	220	220	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	185	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85	85	85
Na ₂ ЭДТА	18.65	18.65	18.65	18.65
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	13.9	13.9	13.9
<i>MS микросоли</i>				
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
KI	0.83	0.83	0.83	0.83
<i>Витамины и органические вещества, входящие в состав среды MS</i>				
Инозитол	100	100	100	100
Глицин	2.0	2.0	2.0	2.0
Тиамин – HCl	1.0	1.0	1.0	1.0
Пиридоксин HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.5	0.5
Сахароза	20000	20000	20000	10000
Агар	7000	7000	7000	7000
<i>Дополнительные компоненты и гормоны, введенные в среду</i>				
Аскорбиновая кислота	1.0	1.0	1.0	1.0
Глутамин	20	20	20	20
Цефотаксим	800	600	400	400
TDZ (тидазулон)	0.05–0.1	–	–	–
ВА (N ⁶ -бензаминопурин)	0.2	0.4–0.6	–	–
НАА (нафтоаленацетиновая кислота)	0.01	–	–	–
ИВА (3-индолилмасляная кислота)	–	0.1	–	0.25–0.5
Кинетин	–	–	0.1	0.1

конгломерат каллусных клеток. Побегі размножали на тех же средах, в которые вводили гормоны: 6-ВАР (от 0.4 до 0.6 мг/л) и по 0.1 мг/л ИВА.

Побегі культивировали в плоскодонных колбах объемом 100 мл в течение 15–20 дней при температуре 25 °С и 16-часовом освещении. На конгломерате каллуса развивались многочисленные побегі.

Побегі размером 2 см и более переносили на среду для последующего роста и удлинения. Среда содержала те же компоненты (табл. 1), но

в нее вводили цефотаксим (400 мг/л) и гормон для роста побегов – кинетин (0.1 мг/л) (табл. 1).

Культивировали растения в течение 15–20 дней при 25 °С и 16-часовом освещении. Дальнейшее увеличение числа побегов осуществлялось путем переноса каллусной массы с зачатками побегов на новую среду для размножения и культивировали в течение 15–20 дней при тех же условиях. Побегі доращивали до высоты 3–4 см, затем их отделяли от каллуса для последующего укоренения.

Для укоренения использовали среды, содержащие меньшее количество сахарозы (10000 мг/л). В среде присутствовали цефотаксим (400 мг/л) и гормоны: кинетин (0.1 мг/л) и ИВА (от 0.25 до 0.5 мг/л). Побеги, помещенные на среду для укоренения, находились сначала 5 дней в темном помещении, а затем их переносили в условия освещения при температуре 25 °С на 15–20 дней. Побеги, образовавшие корни, пересаживали в стерилизованный субстрат, состоящий из равных частей песка, вермикулита и лесной почвы, взятой под деревьями тополя. Почвенный субстрат обильно поливали дистиллированной водой, сосуды прикрывали крышкой для сохранения влаги. По мере увеличения размеров растений, их с почвенным комом переносили в сосуд большего объема и добавляли уже не стерильную лесную почву. Полученные данные обработаны статистически с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel и Статистика (версия 13.3, Stat Soft Inc., USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стерилизация растительных эксплантов, используемых в экспериментах, предполагала как увеличение ее длительности, так и расширение перечня дезинфицирующих веществ. Наиболее

эффективными оказались более длительные (от 2 до 3 мин в зависимости от толщины побега) обработки материала дезинфицирующими веществами и добавление в среду антибиотика (табл. 2).

Наличие скрытой внутренней инфекции у поверхностно стерилизованных эксплантов тополя подтвердили экспериментальные работы. На среде без антибиотика у основания экспланта уже на 10-й день культивирования появлялась бактериальная инфекция. Подобранные экспериментально варианты стерилизации и среды с антибиотиком (табл. 2) позволили получить 95 % стерильность эксплантов. Для индукции пазушной меристемы листа тополя использовали MS, ½ MS среды и разный состав гормонов. Пробуждение меристемы происходило не одинаково при использовании различных концентраций гормонов (табл. 3).

Активация пазушных меристем листа у эксплантов начиналась с появления зеленого бугорка в пазухе листа на 6-й день, а массовые зачатки побега появились на 10–12-й день культивирования (рис. 1, б). В опыте 3 и 4 рост меристемы наблюдали у максимального количества эксплантов (табл. 3). Следует заметить, что эффективность использования TDZ для культуры тканей древесных растений отмечали ранее (Huetteman, Preece, 1993).

Таблица 2. Количество стерильных эксплантов, полученных при разных способах стерилизации

Номер опыта	Обработка, мин			Количество	
	раствором Domestos	70%-м этиловым спиртом	0.2%-м диацидом	цефотаксима в среде, мг/л	стерильных эксплантов на 10-й день культивирования, %
1	10	0.5	1	–	4
2	20	0.5	2	400	62
3	20	1	3	600	70
4	30	1	3	800	83
5	30	2	3	800	95

Таблица 3. Влияние состава среды и гормонов на рост пазушной меристемы листа тополя корейского

Номер опыта	Число эксплантов, шт.	Среда	Гормоны, мг/л	Рост пазушной меристемы, %
1	50	MS	0.2 BA, 0.05 TDZ	67
2	60	½ MS	0.2 BA, 0.1 TDZ	74
3	75	MS	0.2 BA, 0.05 TDZ, 0.01 NNA	81
4	100	½ MS	0.2 BA, 0.1 TDZ, 0.01 NAA	92

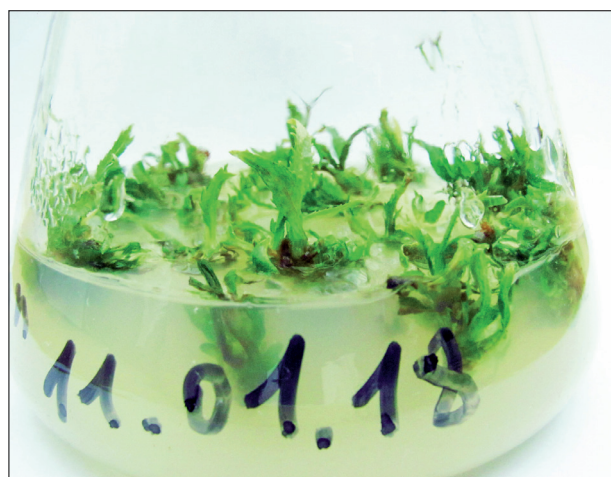


Рис. 2. Образование множества побегов тополя корейского на конгломерате каллусных клеток на среде $\frac{1}{2}$ MS под действием гормонов (0.5 мг/л ВА и 0.1 мг/л ИВА).

Использование смеси гормонов для активации пазушной меристемы имело положительный эффект и в работе с побегами пирамидального тополя (Gamburg, Voinikov, 2013). В наших опытах самым эффективным оказалось применение трех гормонов (TDZ, ВА и NAA) для активации меристемы при культивировании на среде $\frac{1}{2}$ MS (табл. 3).

Причем, в опыте 4 увеличение количества TDZ до 0.1 мг/л привело к повышению числа пробудившихся почек на 11 %. Активное развитие побега и появление от 1 до 3 листочков наблюдали с 30-го дня посадки эксплантов (рис. 1, б). После двух пассажей подросшие побеги пересаживали на среду для размножения.

На находящейся в этой части экспланта активно нарастала каллусная масса. Побеги тополя активно разрастались на конгломерате каллуса под действием гормонов ВА и ИВА (рис. 2).

Эти побеги различались по скорости роста и размерам, при этом морфологических различий у них не наблюдали.

Отдельные клоны различались по количеству продуцирующих побегов. За год культивирования тополя корейского от каждого экспланта получено от 60 до 267 побегов-регенерантов (табл. 4).

Например, клоны 1/1, 1/8 и 1/14 формировали на каллусе максимальное число побегов. Применение разных концентраций ВА (от 0.4 до 0.6 мг/л) и наличие в среде ИВА (0.1 мг/л) способствовало активному образованию побегов. Тем не менее наибольшее число побегов образовалось при концентрации в среде ВА в количестве 0.6 мг/л (табл. 4).

Таблица 4. Влияние количества ВА на появление побегов при выращивании тополя корейского *in vitro*

Номер клона	Среда	Гормоны, мг/л	Число побегов, образовавшихся за год культивирования, шт.
1/1	$\frac{1}{2}$ MS	0.4 ВА, 0.1 ИВА	102
1/3			60
1/6			87
1/8			118
1/14			98
1/1	$\frac{1}{2}$ MS	0.5 ВА, 0.1 ИВА	167
1/3			91
1/6			103
1/8			152
1/14			148
1/1	$\frac{1}{2}$ MS	0.6 ВА, 0.1 ИВА	267
1/3			194
1/6			183
1/8			197
1/14			202

В эксперименте с побегами осины, выращенными *in vitro*, также были получены растения двух типов: обладающие быстрым ростом и медленно растущие (Петрова, Калашникова, 2014). По морфологическим показателям эти растения не отличались друг от друга, однако проведенные авторами биохимические исследования выявили различия по содержанию в них растворимых фенольных соединений.

Генетическая нестабильность обнаружена у клонов березы (*Betula L.*), полученных в результате соматоклональной изменчивости растений при выращивании *in vitro* (Константинов, Пантелеев, 2014). К сожалению, нами пока не установлены ни химические, ни генетические различия среди полученных нами клонов тополя корейского.

Исследованиями некоторых авторов показано (цит. по: (Лебедев и др., 2012)), что на частоту соматоклональной изменчивости растений влияют генотип растений, источник эксплантов, концентрация гормонов, состав среды и продолжительность культивирования. В экспериментах, например, наибольшее количество побегов появлялось на начальных этапах культивирования. При дальнейших четырех-пяти пассажах число побегов, как правило, уменьшалось, а их жизнеспособность снижалась.

Следующим этапом культивирования была пересадка регенерантов на среду для роста (см. табл. 1). Побеги после пересадки их на среду с кинетином постепенно увеличивались в размерах. Изменчивость по высоте побегов тополя

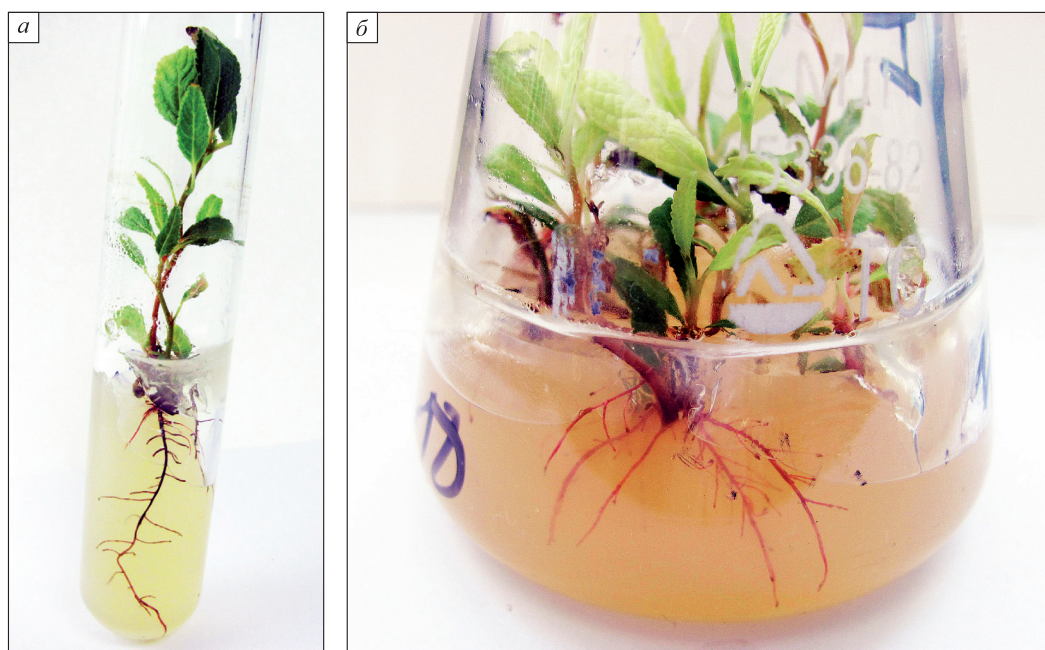


Рис. 3. Образование корней у тополя корейского на среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащей 10000 мг/л сахарозы, 0.5 мг/л ИВА и 0.1 мг/л кинетина.

корейского проявлялась и при дальнейшем их выращивании. Наблюдали спонтанное появление корней на среде для роста. Такое явление отмечено во время культивирования разных листовенных пород.

Например, образование корней у берез происходило и на безгормональной среде (Машкина и др., 2019).

Достигшие длины 3 см и более регенеранты тополя пересаживали на среду для укоренения, содержащую ИВА и кинетин (табл. 1). Укоренялось около 97 % побегов, отдельные побеги имели мощную корневую систему, состоящую из 3–4 корней (рис. 3).

Длина корней у регенерантов варьировала от 1 до 5–7 см. Незначительное число побегов (менее 5 %) пожелтело и засохло, не образуя корней. Далее растения с корнями пересаживали для адаптации в стерильный субстрат, состоящий из равных частей песка, вермикулита и лесной почвы. Для сохранения влаги сосуды накрывали крышками (рис 4).

При контейнерном выращивании древесных пород за рубежом большое внимание уделяют почвенным условиям, а особенно содержанию в почве микоризообразующих грибов (Бурцев, 2014). При адаптации растений к нестерильному субстрату нами использовалась лесная почва из-под деревьев тополя.

Более мощные и высокие растения тополя успешно переносили пересадку, а слабые кло-

ны усыхали и погибали при тех же условиях выращивания. При этом морфологических отклонений от развития, полученных микроразмножением растений, не обнаружено. В среднем высота полученных регенерантов тополя варьировала от 10 до 20 см. Одна часть растений отличалась быстрым ростом в высоту, другие растения развивались очень медленно. Наиболее высокие экземпляры растений были у клонов 1/1, 1/8 и 1/14, их высота варьировала от 18 до 30 см (табл. 5, рис. 5).

Анализ экспериментальных данных показал, что коэффициент варьирования высоты всех полученных клонов имеет широкий диапазон изменчивости (от 20 до 60 %): у клона 1/3 отмечен



Рис. 4. Адаптация клонов тополя корейского на субстрате песок – вермикулит – почва.

Таблица 5. Показатели изменчивости высоты клонов при размножении тополя корейского *in vitro*

Номер клона	Высота растений, см		
	min–max	$\bar{x} \pm S_x$	CV, %
1/1	1.52–30.00	14.97 ± 4.49	29.99
1/3	9.07–12.31	10.40 ± 2.04	19.62
1/6	2.04–10.52	6.78 ± 3.32	48.96
1/8	2.02–24.50	9.58 ± 5.76	60.13
1/14	5.01–18.04	9.00 ± 5.47	60.70

Примечание. \bar{x} – среднеарифметическое значение признака в выборке; S_x – среднеквадратичное отклонение; min – max – диапазон варьирования признака; CV – коэффициент варьирования признака; $n = 30\text{--}50$ растений.

самый низкий коэффициент варьирования высоты, у самого высокого клона 1/1 он оказался около 30 %, а у имеющие средние данные по высоте клонов 1/8 и 1/14 он был максимальным (табл. 5).

Можно предположить, что в данном случае (рис. 5) появление растений с различной скоростью роста – результат проявления соматоклональной изменчивости. Однако этот факт требует дальнейшего подтверждения.

В настоящее время есть гипотеза, согласно которой существует своеобразный «порог» соматоклональной изменчивости растений. Он представляет собой аналог «бутылочного горлышка» эволюции, пройти через который смогут только жизнеспособные соматоклоны, а растения, содержащие вредоносные мутации, погибнут (Wang Q. M., Wang L., 2012).

Возможно, подтверждением такой гипотезы может служить гибель в наших экспериментах более 30 % клонов, перенесших «стресс» при

**Рис. 5.** Изменчивость высоты клонов тополя корейского при размножении *in vitro*.

пересадке сначала в стерильный субстрат и далее при переносе растений в почвенные условия. Усыхание побегов тополя наблюдали, как отмечалось выше, и на среде для ризогенеза.

Таким образом, при размножении тополя корейского *in vitro* были получены стерильные растения-регенеранты разной высоты (рис. 5). Вероятно, это результат проявления соматоклональной изменчивости вида. Однако это явление требует подтверждения на основе генетических исследований полученных растений. На примере тополя корейского подтверждены выводы К. Z. Gamburg и V. K. Voinikov (2013) о возможности получения растений с разной скоростью роста при выращивании тополя *in vitro* без его генной модификации.

В настоящее время резкое истощение эксплуатационных лесов на Дальнем Востоке России ведет к снижению динамики заготовки древесины (Лашина, 2023). Развитие плантационного выращивания быстрорастущих деревьев – единственный путь получения сырья для лесной промышленности региона.

По этому пути активно идет Китайская Народная Республика, которая лидирует в мире по получению плантационной древесины. Масштабы работ по выращиванию тополей в Китае огромны, государственная программа предполагает в будущем ежегодно заготавливать по 150 млн м³ тополевой древесины (Царев, Царева, 2017).

В 2016 г. ДальНИИЛХ (Хабаровск) впервые проведена работа по интродукции 16 сортов высокопродуктивных тополей селекции ВНИИЛ-ГИСбиотех (Воронеж). Приживаемость черенков в среднем составила 50 %, а сохранившиеся растения успешно перенесли зиму (Алексеевко, Никитенко 2017). Тем не менее авторы этой работы полагают, что более адаптированы для плантационного выращивания в специфических условиях Дальнего Востока местные виды тополей. Следует заметить, что интродукцией и разведением тополя корейского, например, активно занимаются в Белоруссии (Кулагин и др., 2016), где получены высокие ростовые показатели.

На заповедных территориях Дальнего Востока еще сохранились гигантские по своим размерам деревья разных видов тополей, дуба монгольского (*Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.) и ильма долинного (*Ulmus propinqua*). Вероятно, среди них встречаются и перспективные для размножения полиплоидные особи. Поиски естественных гибридов и полиплоидов быстрорастущих деревьев в сочетании с современными

биотехнологическими методами размножения могут стать альтернативным и дешевым способом получения высокопродуктивных и устойчивых деревьев по сравнению с их модификацией. Тополь корейский можно считать одной из самых перспективных в регионе древесных пород для создания будущих промышленных плантаций (Алексеев, Никитенко 2017; Орехова, 2019).

В целях создания ресурсной базы для развития плантационного выращивания деревьев необходимо провести на Дальнем Востоке России генетические исследования уникальных экземпляров местных древесных видов. Необходимы ревизия и создание новых объектов ЕГСК основных лесообразующих и ценных древесных пород. Дальнейшее развитие системы лесопользования и лесовосстановления невозможно сегодня без внедрения в лесное хозяйство региона современных биотехнологических методов размножения и выращивания древесных пород.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данных исследований является запатентованная технология размножения растений тополя корейского *in vitro* (Орехова и др., 2019). При выращивании регенерантов тополя корейского *in vitro* были получены растения, обладающие разными ростовыми показателями. Цикл получения растений по предложенному методу (от момента обрезки побегов тополя до получения регенерантов, выращенных в горшках с закрытой корневой системой) составляет от 12 до 14 мес. Полученные *in vitro* растения не имеют грибных, бактериальных и вирусных инфекций, не образуют «пуха» и способны размножаться черенкованием.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, тема № 121031000144-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аксенов А. С., Кузьмина Н. А. Бактериальные эндофиты тополя // ИВУЗ. Лесн. журн. 2018. № 4. С. 161–166.
Алексеев А. Ю., Никитенко Е. А. Перспективы создания лесных плантаций на Дальнем Востоке России // Лесн. вестн. 2017. Т. 21. № 4. С. 15–18.
Бурычев Д. С. Зарубежный опыт искусственной микоризации семян лесных древесных пород с закрытой корневой системой // Тр. СПбНИИЛХ. 2014. № 1. С. 47–61.

Исаева Е. В., Рязанова Т. В., Гаврилова Л. В. Групповой химический состав листьев тополя // Sci. Euror. 2016. № 8 (8). С. 116–121.
Климов А. В., Прошкин Б. В. Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. × jirtyschensis* в зоне гибридизации // Вавилов. журн. генет. и селекц. 2018. Т. 22. № 4. С. 468–475.
Константинов А. В., Пантелеев С. В. Молекулярно-генетический анализ линий соматональных генотипов березы повислой и березы гибридной // Сиб. лесн. журн. 2014. № 4. С. 75–78.
Кулагин Д. В., Константинов А. В., Богинская Л. А., Острикова М. Я., Падутов В. Е. Сравнение ростовых показателей микроклонально размноженных саженцев различных клонов древесных пород в условиях лесных культур // Тр. БГТУ. Сер. 1: Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. 2016. № 1 (183). С. 110–114.
Лашина Е. В. Эксплуатационные особенности лесов Дальнего Востока // Сиб. лесн. журн. 2023. № 2. 56–64.
Лебедев В. Г., Шестибратов К. А. Опыт создания биотехнологических форм древесных растений // Лесоведение. 2015. № 3. С. 222–232.
Лебедев В. Г., Шестибратов К. А. Генная инженерия биосинтеза лигнина в деревьях: компромисс между свойствами древесины и жизнеспособностью растений // Физиол. раст. 2021. Т. 68. № 4. С. 339–355.
Лебедев В. Г., Азарова А. Б., Шестибратов К. А., Деменко В. И. Проявление соматональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // Изв. ТСХА. 2012. Вып 1. С. 153–163.
Лебедева М. В., Таранов В. В. Современные геномные технологии в фундаментальных и прикладных исследованиях рода *Populus* L. // Тр. СПбНИИЛХ. 2019. № 4. С. 57–71.
Машкина О. С. Испытание триплоидных гибридов тополя в условиях Воронежской области // Сиб. лесн. журн. 2016. № 5. С. 72–80.
Машкина О. С., Табацкая Т. М., Внукова Н. И. Технология долгосрочного хранения в культуре *in vitro* ценных генотипов березы и выращивание на ее основе посадочного материала // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 3. С. 57–67.
Орехова Т. П. Перспективы применения биотехнологических методов для ускоренного выращивания древесных пород Приморского края // Агр. вестн. Приморья. 2019. № 1 (13). С. 44–47.
Орехова Т. П., Баркалова О. К., Михеева А. В. Способ клонального микроразмножения тополя корейского (*Populus koreana* Render). Патент РФ на изобр. RU № 2704839. М.: Роспатент, 2019. 16 с.
Петрова Г. А., Калашишкова Е. А. Изучение соматональной изменчивости при получении растений – регенерантов осины из каллусной ткани // Совр. пробл. науки и образования. 2014. № 1. С. 124.
Сиволапов А. И. Алотриплоидные клоны тополя сереющего (*Populus canescens* SM), отобранные в пойме Хопра и Дона – крупное достижение кафедры лесных культур в селекционном лесоводстве // Усп. совр. естествозн. 2020. № 2. С. 25–30.
Сиволапов А. И., Сиволапов В. А. Системы селекции тополей в связи с системами их размножения // Актуал.

- напр. науч. иссл. XXI в.: Теор. и практ. 2020. Т. 8. № 1 (48). С. 144–149.
- Сосудистые растения Советского Дальнего Востока / Отв. ред. С. С. Харкевич. СПб.: Наука, 1995. Т. 7. С. 146–155.
- Тараканов В. В., Паленова М. М., Паркина О. В., Роговцев Р. В., Третьякова Р. А. Лесная селекция в России: достижения, приоритеты (обзор) // Лесохоз. информ. 2021. № 1. С. 100–143.
- Царев А. П., Царева Р. П. Некоторые аспекты развития плантационного лесоразведения в Китайской Народной Республике // Леса России: политика, промышленность, образование: Материалы Второй Междунар. науч.-техн. конф., Санкт-Петербург, 24–26 мая 2017 г. СПб: СПбГЛТУ, 2017. Т. 1. С. 168–171.
- Царев А. П., Царева Р. П., Царев В. А., Ленченкова О. Ю., Милигула Е. Н. Сортоиспытание и отбор гибридов тополя для полезащитных насаждений // Лесотех. журн. 2019а. Т. 1. № 1 (33). С. 93–100.
- Царев А. П., Плугатарь Ю. В., Царева Р. П. Селекция и сортоиспытание тополей: моногр. Симферополь: АРИАЛ, 2019б. 252 с.
- Царев В. А. Многолетнее сортоиспытание межсекционных гибридов тополя в условиях Центрально-Черноземной лесостепи // Лесотех. журн. 2019. Т. 9. № 1 (33). С. 102–115.
- Шабунин Д. А., Бутенко О. Ю. Получение мутантов высокопродуктивных генотипов тополя сереющего с использованием метода индуцированного мутагенеза в условиях культуры *in vitro* // Тр. СПбНИИЛХ. 2021. № 2. С. 4–16.
- Эрст А. А., Шишкин С. В., Воронкова М. С. Получение межвидовых гибридов (*Populus alba* × *P. bolleana* × *P. canescens*) с использованием культуры *in vitro* // Сиб. лесн. журн. 2019. № 2. С. 45–52.
- Ahuja M. R. Fate of forest tree biotechnology facing climate change // *Silva Genet.* 2021. V. 70. Iss. 1. P. 117–136.
- Bacenetti J., Bergante S., Faccioto, Fiala M. Woody biofuel production from short rotation coppice in Italy: Environmental-impact assessment of different species and crop management // *Biomass & Bioenergy.* 2016. V. 94. P. 209–219.
- Cai X., Kang X. Y. In vitro tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. Iss. 9. P. 1771–1778.
- Douglas C. J. *Populus* as a model tree // Comparative and Evolutionary Genomics of Angiosperm Trees. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. / A. Groover, Q. Cronk (Eds.). Springer Int. Publ. Switzerland, 2017. V. 21 P. 61–84.
- Eriksson M. E., Israelsson M., Olsson O., Moritz T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length // *Nature Biotechnol.* 2000. V. 18. P. 784–788.
- Gamburg K. Z., Voinikov V. K. Somaclonal variations as mean for obtaining regenerants with different growth rate in poplar (*Populus* × *berolinensis* Dipp.) // *Nat. Sci.* 2013. V. 5. N. 5. P. 599–607.
- Huetteman C. A., Preece J. E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plants tissue culture // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1993. V. 33. Iss. 2. P. 105–119.
- Lasarus W., Headley W. I., Zalesny R. S. Impacts of supplyshed-level. Differences in productivity and land costs on the economics of hybrid poplar production in Minesota, USA // *Bioenergy Res.* 2015. V. 8. Iss. 1. P. 231–248.
- Lebedev V. G., Shestibratov K. A. Genetic engineering of lignin biosynthesis in trees: compromise between wood properties and plant viability) // *Rus. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. N. 4. P. 596–612 (Original Rus. text © 2021, V. G. Lebedev, K. A. Shestibratov publ. in *Fiziologiya rasteniy.* 2021. V. 68. N. 4. P. 339–355).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays wit tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. Iss. 3. P. 473–497.
- Nelson N. D., Berguson W. E., McMahon B. G., Buchman D. J. Growth performance and stability of hybrid poplar clones in simultaneous tests on six sites // *Biomass & Bioenergy.* 2018. V. 118. P. 115–125.
- Nelson N. D., Meilan R., Berguson W. E., McMahon B. G., Cai M., Buchman D. Growth performance of hybrid poplar clones on two agricultural sites with and without early irrigation and fertilization // *Silvae Genet.* 2019. V. 68. Iss. 1. P. 58–66.
- Rubert-Nason K. F., Lindroth R. L. Causes and consequences of condensed tannin variation in *Populus* // *Recent Advances in Polyphenol Research V. 7* / J. D. Reed, V. A. Pereira de Freitas, S. Quideau (Eds.). John Wiley & Sons Ltd., 2021. P. 69–112.
- Shani Z., Dekel M., Tsabary G., Goren R., Shoseyov O. Growth enhancement of transgenic poplar plants by overexpression of *Arabidopsis thaliana* endo-1,4-β-glucanase (cell) // *Mol. Breed.* 2004. V. 14. Iss. 3. P. 321–330.
- Van Acker R., Leple J. C., Aerts D., Storme V., Goeminne G., Ivens B., Legee F., Lapierre C., Piens K., Van Montagu M. C., Santoro N., Foster C. E., Ralph J., Soetaert W., Pilate G., Boerjan W. Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase // *PNAS.* 2014. V. 111. Iss. 2. P. 845–850.
- Wang Q. M., Wang L. An evolutionary view of plants tissue culture: somaclonal variation and selection // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. Iss. 9. P. 1533–1547.
- Wang C., Bao Y., Wang Q., Zhang H. Introduction of the rice CYP_{714D1} gene into *Populus* inhibits expression of its homologous genes and promotes growth, biomass production and xylem fibre length in transgenic trees // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. Iss. 10. P. 2847–2857.

REPRODUCTION OF KOREAN POPLAR *in vitro*

T. P. Orekhova

*Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of East Asia,
Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch
Prospekt 100-letiya Vladivostoka, 159, Vladivostok, 690022 Russian Federation*

E-mail: tp.orekhova@mail.ru

The patented method for introducing *in vitro* culture and obtaining regenerates from young shoots of Korean poplar (*Populus koreana* Rehder) plus tree of the male genotype are discussed in the article. Modified MS and ½ MS media supplemented with an antibiotic and hormones were used for cultivation. To activate the axillary meristem, a combination of hormones was used in the following concentrations: 0.2 mg/l BA; 0.05–0.1 mg/l TDZ; 0.01 mg/l NAA. The shoots were multiplied on the same media using hormones: 0.4–0.6 mg/l BA and 0.1 mg/l IBA. Shoot growth was performed using the hormone 0.1 mg/l kinetin, and shoot rhizogenesis in the presence of 0.25–0.5 mg/l IBA and 0.1 mg/l kinetin. The sterile substrate consisting of equal parts of sand, vermiculite and forest soil was used for plants rooted. Poplar regenerants are differed in growth rate, but no morphological changes among them were observed. Some of the plants are characterized by rapid growth in height, while other plants developed very slowly. The tallest plant specimens in clones 1/1, 1/8 and 1/14 were observed, and their height varied from 18 to 30 cm. We believe that the appearance of plants with different growth rates is the result of the manifestation of somaclonal variability poplar during its cultivation *in vitro*. However, this phenomenon requires further confirmation. The plants obtained by this method do not have fungal, bacterial or viral infections and are able to reproduce by cuttings. The proposed technology enables for their further reproduction poplar for practical purposes.

Keywords: *Populus koreana* Rehder, explant, media, hormones, meristem, shoot, callus, rhizogenesis.

How to cite: Orekhova T. P. Reproduction of Korean poplar *in vitro* // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2024. N. 4. P. 61–71 (in Russian with English abstract and references).