

УДК 582.572.2:633.878.32

ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ ТОПОЛЯ ИЗ ПОЧЕК И ЛИСТЬЕВ

А.А. Эрст, В.Т. Бакулин

Ботанический сад СО РАН,
Россия, 630090, г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101

E-mail: annaerst@yandex.ru

Пазушные почки и листья четырех элитных гибридов и двух видов тополя использованы в качестве исходных эксплантов для клонального микроразмножения. Показаны пути морфогенеза: прямой (адвентивное побегообразование, развитие пазушных почек) и непрямого (геммогенез). Выявлена зависимость ответа эксплантов от генотипа материнского растения. Лучшим морфогенным ответом характеризовались *Populus nigra* и *P. alba* (80 и 72% соответственно). Ключевым фактором для развития побегов из каллусной культуры явилось внесение в среду ГК₃. На этапе мультипликации побегов оптимальной выбрана среда MS + БАП 1 мкМ + ГК₃ 5 мкМ. Полученные прямым и непрямым путем микропобеги успешно укореняли на редуцированной вдвое среде MS.

Ключевые слова: тополь, гибриды, листья, почки, размножение *in vitro*.

Список сокращений: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; ГК₃ – гибберелловая кислота; Кн (кинетин) – 6-фурфуриламинопурин; ИУК – β-индолилуксусная кислота; ИМК – β-индолилмасляная кислота; Зн (зеатин) – 6-(4-гидрокси-3-метилбут-2-еноламино) пурин.

Введение

Представители рода тополь – *Populus L.* (сем. Salicaceae) широко используются для озеленения населенных мест и создания различного типа защитных насаждений. Вегетативное размножение видов и гибридов тополя успешно осуществляется во многих странах [1]. Однако быстрое внедрение ряда элитных форм тополя сдерживается слабой укореняемостью черенков при традиционных методах размножения. Биотехнологические приемы и подходы открывают новые возможности для массового воспроизводства таких растений и являются хорошей альтернативой их размножения.

Род *Populus* является модельной системой, как в области биотехнологии древесных растений, так и в сфере получения древесных растений с улучшенными характеристиками [2]. Этот род занимает почти половину всех работ, касающихся генетической трансформации древесных пород [3]. Однако успех этих технологий напрямую зависит от разработки эффективных протоколов размножения *in vitro* [4]. Виды и гибриды рода *Populus* размножены в культуре тканей и органов растений из различных типов эксплантов: из почек, листьев и корней [5, 6, 7]; из междоузлий [8,9]; из средней жилки листа [10]; из примордий женских сережек [11] и др.

В данном исследовании рассмотрен морфогенетический потенциал различных типов эксплантов четырех, используемых в зеленом строительстве гибридов тополя (т. Сибирский серебристый № 12 и № 4, т. Стройный № 18/4, т. Подмосковный × *P. suaveolens* № 10/1) и двух видов (*P. alba* и *P. nigra*).

Объекты и методы исследования

Растительный материал. Объектами исследований служили четыре быстрорастущих, зимостойких, декоративных гибридов тополя, полученных в ЦСБС СО РАН и два дикорастущих вида.

Тополь Сибирский серебристый № 12 получен в 1980 г. от скрещивания тополя белого (из поймы Оби) с тополем Болле (*P. alba* × *P. bolleana*). Стройное декоративное дерево с прямым стволом и узкой цилиндрической кроной. В 6 лет высота 7.4 м, в 20 лет – 20.6 м. Сравнительно засухоустойчив, газоустойчив, не повреждается ржавчиной. Укоренение зимних (одревесневших) стеблевых черенков в открытом грунте достигает максимально 65% [12].

Тополь Сибирский серебристый № 4 получен в 1980 г. от той же комбинации скрещивания, что и Сибирский серебристый № 12. Обладает сходными с ним свойствами, но отлича-



ется более интенсивным серебристым опушением листьев. В 20 лет высота 22 м. Укореняемость зимних стеблевых черенков невысока – около 50%.

Тополь Стройный № 18/4 получен в 1981 г. от свободного опыления полиплоидной формы C_0 (*P. nigra* × *P. pyramidalis*). Декоративное дерево с прямым стволом и очень узкой кроной. В 7 лет высота 8.4 м, в 20 лет – 20 м. Обладает высокой полевой устойчивостью к ржавчине и пятнистости листьев [13].

Гибрид № 10/1 получен в 1971 г. от контролируемого скрещивания т. Подмосковный × *P. suaveolens*. Стройное дерево с прямым стволом и компактной кроной, состоящей из сравнительно тонких (2–3 см) ветвей. В 16 лет высота 16 м, в 36 лет – 23 м [14].

P. alba и *P. nigra* выделены в естественных насаждениях поймы Оби, на окраине г. Новосибирска. Возраст их около 25 лет. Оба вида весьма зимостойки, экологически пластичны, довольно устойчивы к болезням и энтомовам вредителям, но очень трудно размножаются зимними стеблевыми черенками, что сдерживает более широкое использование их в практике лесного хозяйства.

1–2-летние побеги гибридов были срезаны с молодых (5–15 лет) деревьев второго вегетативного поколения, выращенных на территории ЦСБС.

Растительный материал был взят в два сезона – апрель-март и ноябрь 2011 года. Исходными эксплантами служили пазушные почки и молодые листья, полученные после выгонки побегов. Было испытано два варианта поверхностной стерилизации: 1) 0.1% раствор сульфохлорантина (10 мин.), затем 70% этанол (3 сек.) и 0.1% раствор сулемы (20 мин.); 2) 70% этанол (3 сек.), затем 0.1% раствор сулемы (30 мин.). По окончании стерилизации растительный материал трижды промывали стерильной дистиллированной водой. С почек удаляли все покровные чешуи и часть листьев, оставляя два, наиболее глубоко расположенных листочка и помещали экспланты на питательную среду.

Среды для культивирования. Испытаны различные составы питательных сред: Мурасиге и Скуга (MS) [15], Уинтона (W) [16], Симола (N6, S) [17]. Среды содержали 3% сахарозу и 0.6% агар (Difco, USA). Автоклавирование среды проводили при 121°C в течение 20 мин, pH среды доводили до 5.8. Минеральную основу дополняли различными регуляторами роста и физиологически активными добавками (табл. 1). Экспланты культивировали в следующих условиях: фотопериод – 16/8 часов свет/темнота, освещенность – 2–3 клк, температура – 24±1°C.

Таблица 1

Состав питательных сред, используемых для размножения гибридов и видов тополя

Вариант	Состав среды
MS (1)	MS + 2,4 Д 5 мкМ + БАП 1 мкМ + гидролизат казеина 1 г/л
MS (2)	MS + 2,4 Д 5 мкМ + БАП 1 мкМ + гидролизат казеина 1 г/л + кокосовая вода 5%
MS (3)	MS + БАП 1 мкМ + ГК ₃ 5 мкМ
MS (4)	MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л
MS (5)	MS + БАП 7 мкМ + НУК 0.3 мкМ
MS (6)	MS + БАП 8 мкМ + ГК ₃ 5 мкМ + аскорбиновая кислота 100 мг/л
MS (7)	½ MS + БАП 10 мкМ + ГК ₃ 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л + аскорбиновая кислота 100 мг/л
MS (8)	MS + кокосовая вода 5%
MS (9)	MS + Кн 1.25 мкМ + ИУК 1.25 мкМ
MS (10)	½ MS
MS (11)	½ MS + ИМК 5 мкМ + аскорбиновая кислота 100 мг/л
N6 (1)	N6 + 2,4-Д 10 мкМ + Кн 2.5 мкМ
N6 (2)	N6 + Зн 50 мкМ
N6 (3)	N6 + Зн 25 мкМ + ГК ₃ 50 мкМ
W (1)	W + 2,4-Д 0.2 мкМ + Кн 5 мкМ
W (2)	W + БАП 0.75 мкМ

Наблюдение и учет результатов. Все эксперименты проводились в 2–3 повторностях. Статистическая обработка результатов осуществлялась путем расчетов с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel. В таблицах показаны средние арифметические величины и доверительные интервалы. Доверительность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости $P < 0.05$ [18].

Наблюдения проводили в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) на микроскопе Stereo Discovery V 12 (Carl Zeiss, Germany).

Результаты и их обсуждение

Культура листовых эксплантов. Молодые листья тополя помещали на среды для прямой регенерации побегов MS (9) (жидкие и твердые) и для индукции каллусообразования MS

(1), MS (2), N6 (1) и W (1) (рис. 1, 2). Использование жидких сред на этапе введения в культуру является наиболее эффективным способом, особенно для древесных растений, в связи с фенольным окислением тканей эксплантов. Так, использование жидкой среды MS оказалось оптимальным вариантом для прямой регенерации побегов *P. deltoides* [6]. В нашем эксперименте

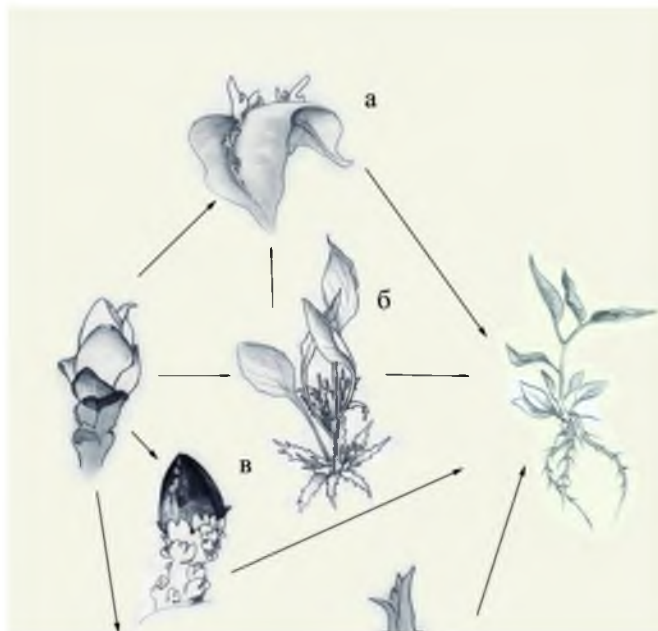


Рис. 1. Пути морфогенеза изучаемых представителей рода *Populus* в культуре *in vitro*: а) прямая регенерация побегов из средней жилки листа; б) развитие пазушных почек побега; в) адвентивное побегообразование в основании почки; г) непрямой геммогенез

каллусообразования не происходила. Через месяц культивирования каллусы были пересажены на среды для регенерации побегов MS (2) – MS (9), N6 (2), N6 (3) и W (2) в условия фотопериода. На свету они приобрели зеленую и зелено-красную окраску. На средах MS (8) и W (2) наблюдали заложение меристематических очагов у тополя Сибирского серебристого №4 и тополя Подмосковный×*P. suaveolens*, но дальнейшего развития побегов на данных средах не происходило. На средах, содержащих кокосовую воду (MS (2) и MS (8)), отмечен только ризогенез.

Стабильную морфогенную каллусную культуру всех изучаемых гибридов и видов тополя получили на среде N6 (2). На данной среде возможно длительное время поддерживать каллусную культуру без потери морфогенности. Дальнейшее развитие и рост побегов происходили только при добавлении в среду, совместно с Зн, ГК₃ – N6 (3). Гиббереллины используют чаще всего для вытягивания укороченных побегов, как, например, для *P.×euramericana* [8]. Роль ГК₃ проявляется и в синергическом эффекте с другими регуляторами роста, в том числе с цитокининами. Известно, что обработка растений гиббереллинами значительно увеличивает митотическую активность [19]. Так, например, только при внесении в среду для культивирования ГК₃ был получен морфогенный ответ у *Betula schmidtii* [20]. Данные наших исследований приведены в таблице 2.

на среде MS (9) у изучаемых гибридов и *P. nigra* наблюдался рост и оводнение листьев и только у *P. alba* происходила прямая регенерация побегов из средней жилки листа (рис. 2г).

На регенерацию побегов через каллусную культуру влияют следующие факторы: генотип растения, тип экспланта, состав питательной среды. Для получения каллусов молодые листья делили на части и помещали горизонтально адаксиальной стороной на питательные среды. Каллусообразование наблюдали через 20 дней культивирования в термостате в условиях темноты. Все изучаемые виды и гибриды тополя были способны к образованию каллуса, дедифференциация тканей шла в первую очередь в местах среза листа. Частота каллусообразования на средах MS (1), MS (2), N6 (1) составила 100%, на среде W (1) около 60%. Использование среды MS, дополненной 2,4-Д оказалось эффективным для индукции каллусообразования многих представителей рода *Populus*: *P. angustifolia*, *P. balsamifera*, *P. deltoides* [9].

Регенерация побегов у изучаемых гибридов и видов тополя на среде для

Таблица 2

Регенерация побегов у представителей рода *Populus* в каллусной культуре *in vitro*, n=10

Вид, гибрид	% морфогенеза	Количество побегов, шт./экспл
Т. Сибирский серебристый № 4	25	5.3±1.4
Т. Сибирский серебристый № 12	15	4.5±2.0
Т. Стройный № 18/4	10	3.5±1.6
Т. Подмосковный× <i>P. suaveolens</i> № 10/1	14	3.3±1.2
<i>P. alba</i>	72	5.4±2.1
<i>P. nigra</i>	80	7.6±1.5

Невысокая частота регенерации побегов гибридов тополя возможно объясняется длительным культивированием на среде с ауксинами. В работе Р. Maheshwari и I. Kovalchuk [9] отмечено, что только короткий период культивирования эксплантов (6–10 дней) на среде для

калусообразования способствует дальнейшей высокой регенерации побегов. Количество побегов на каллусе также было видоспецифично, наибольшее число побегов развивалось у *P. nigra* (см. табл. 2).

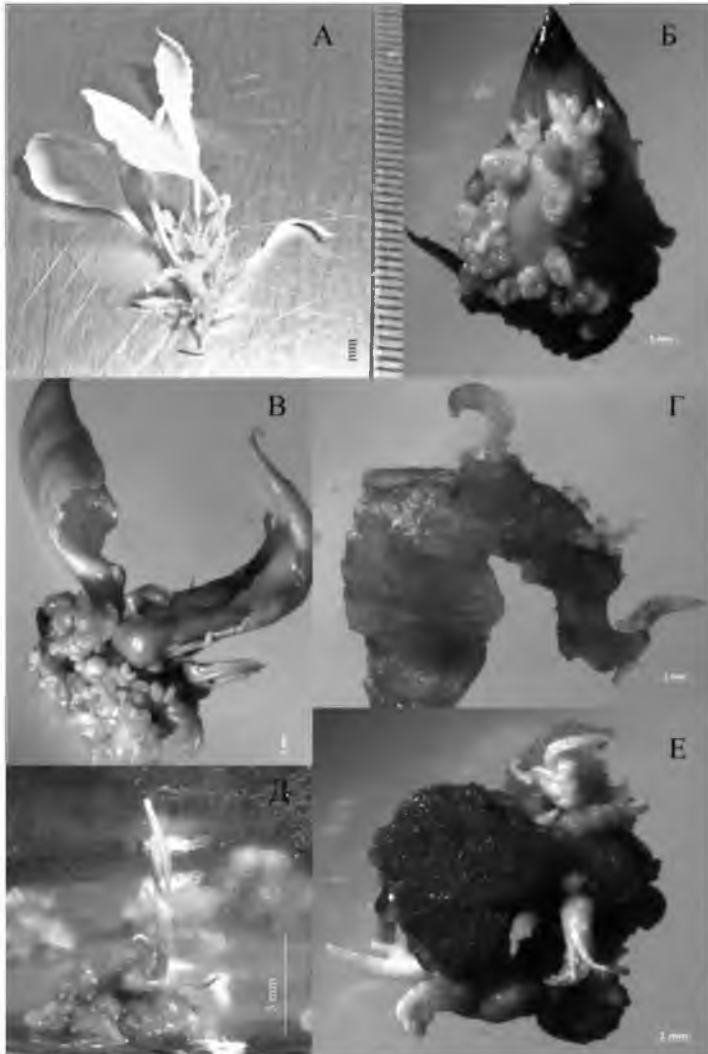


Рис. 2. Морфогенез *in vitro* представителей рода *Populus*: А. Развитие пазушных почек тополя Сибирского серебристого №12 на среде MS + Кн 1.25 мкМ + ИУК 1.25 мкМ. Б. Адвентивное побегообразование в основании почки тополя Стройного на среде MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л. В. Адвентивное побегообразование в основании почки *P. nigra* на среде MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л. Г. Адвентивное побегообразование на средней жилке листа *P. alba* на среде MS + Кн 1.25 мкМ + ИУК 1.25 мкМ. Д. Регенерация побегов тополя Подмосковный × *P. suaveolens* из каллуса на среде N6 + Zn 25 мкМ + ГК₃ 50 мкМ. Е. Регенерация побегов тополя Сибирского серебристого №4 из каллуса на среде N6 + Zn 25 мкМ + ГК₃ 50 мкМ

лей рода *Populus* как *P. deltoides*, *P. ×euramericana* [6,8]. Наши исследования показывают, что применение высоких концентраций БАП (более 5 мкМ) действует негативно на все изучаемые тополя, кроме *P. nigra*. Оптимальной для развития и роста побегов оказалась среда MS (3). Побеги тополя Сибирского серебристого №12 характеризовались также хорошим ростом на среде MS (9).

Культура пазушных почек. Почки гибридов и видов тополя вводили в культуру *in vitro* осенью (ноябрь). Через две недели культивирования почти все почки проявили ответ на среде MS (4). На данной среде у тополя Стройного и *P. nigra* развивались адвентивные побеги у основания почки, у тополей Сибирского серебристого №12 и №4 и *P. alba* происходило развитие пазушных почек на побеге. Различия в морфогенном ответе эксплантов объясняются происхождением гибридов. Тополь Стройный – гибрид *P. nigra* × *P. pyramidalis*, проявил схожий морфогенный ответ в культуре *in vitro* с *P. nigra*. Тополя Сибирский серебристый №12 и №4 – гибриды *P. alba* × *P. bolleana* имели одинаковый ответ с *P. alba*. Эти данные еще раз подтверждают строгую зависимость морфогенного ответа экспланта от генотипа материнского растения. Наибольшее количество почек развивалось у *P. nigra* и т. Стройного за счет образования большого количества адвентивных почек (23.8 и 15.4 соответственно) (табл. 3).

Среда MS (4) оказалась универсальной для всех изучаемых видов и гибридов на этапе введения почек в культуру *in vitro*, однако дальнейшее культивирование эксплантов на данной среде влияло негативно на показатели роста и развития. Наши данные показывают, что для заложения адвентивных почек и стимуляции развития пазушных почек необходимы высокие концентрации БАП. Для дальнейшего роста и развития почек необходимо культивировать экспланты на средах того же состава, но с уменьшенным в 5 раз содержанием цитокининов.

Мультипликация и укоренение побегов. Для мультипликации побегов, полученных прямым и непрямим путем, применяли среды MS (3) – MS (9). Ранее сообщалось, что использование среды MS было эффективным для таких представите-

Таблица 3
Регенерация побегов у представителей рода *Populus* в культуре пазушных почек *in vitro*,
n=10

Вид, гибрид	% морфогенеза	Количество побегов, шт./экспл
Т. Сибирский серебристый № 4	100	6.0±1.2
Т. Сибирский серебристый № 12	100	5.6±1.8
Т. Стройный № 18/4	80	15.4±2.0
Т. Подмосковный× <i>P. suaveolens</i> № 10/1	—*	—*
<i>P. alba</i>	100	5.3±1.6
<i>P. nigra</i>	90	23.8±3.5

Примечание: * – нет данных.

Для укоренения микропобегов использовали среды MS (10) и MS (11). Все изучаемые представители рода *Populus* проявили способность к укоренению на данных средах. На среде с ИМК ризогенез происходил быстрее, но при этом наблюдали развитие каллуса. Поэтому без-гормональная среда выбрана как оптимальная для стадии ризогенеза.

Заключение

Таким образом, для гибридов и видов тополя выявлены прямой (адвентивное побегообразование, развитие пазушных почек) и непрямой (геммогенез) пути морфогенеза. *P. nigra* и *P. alba* характеризуются наибольшей пластичностью, проявляя высокую способность к морфогенезу в культуре *in vitro*. Для развития по прямому пути почки необходимо культивировать на среде MS + БАП 5 мкМ + гидролизат казеина 200 мг/л, а после заложения побегов культивировать на средах с низким содержанием цитокининов. Оптимальной средой для непрямого геммогенеза из листовых эксплантов является среда N6 + Зн 25 мкМ + ГК₃ 50 мкМ, при этом решающую роль в развитии заложившихся почек играет ГК₃. Полученные прямым и непрямым путем микропобеги успешно укореняли на среде MS с редуцированным вдвое содержанием минеральных элементов.

Список литературы

1. Эйзенрейх Х. Быстрорастущие древесные породы / Пер. с нем. – М.: Изд-во иностр. лит., 1959. – 508 с.
2. Jansson S., Douglas C.J. *Populus*: a model system for plant biology // *Annu Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 435–458.
3. Marchadier H., Sigaud P. *Poplars in biotechnology research* // *Unasylva* 221. – 2005. – Vol. 56. – P. 38–39.
4. McCown B.N. *Poplar shoot cultures: their generation and use in biotechnology* / *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus* / Klopfenstein N.B., Chun Y.W., Kim M.-S., Ahuja M.R. eds. Fort Collins, CO. – 1997. – P. 5–9.
5. Ahuja M. R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen // *Silvae Genetica.* – 1983. – Vol. 3, № 3/4. – P. 131–135.
6. Yadav R., Aror P., Kumar D., Katyal D., Dilbaghi N., Chaudhury A. High frequency direct plant regeneration from leaf, internode and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*) // *Plant Biotech. Report.* – 2009. – № 3. – P. 175–182.
7. Raj A.Y., Ho R.H., Zsuffa L. *In vitro* propagation of forest trees by tissue culture // *Proc. 28th Northeastern For Tree Impr. Conf.* – 1983. – P. 218–293.
8. Agrawal V., Gupta S.C. *In vitro* plantlet development from explants of 25-year-old trees of *Populus × euramericana* – a hybrid poplar // *Pl. Sci.* – 1991. – V. 78. – P. 99–105.
9. Maheshwari P., Kovalchuk I. Efficient shoot regeneration from intermodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoides* // *New Biotech.* – 2011. – Vol. 28, № 6. – P. 778–787.
10. Lee-Stadelmann O.Y., Lee S.W., Hackett W.P., Read P.E. The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins // *Plant Science.* – 1989. – Vol. 61. – P. 263–272.
11. Bawa K.S., Stettler R.F. Organ culture with black cottonwood: morphogenic response of female catkin primordia. *Can. J. Bot.* – 1972. – Vol. 50. – P. 1627–1631.
12. *Древесные растения для озеленения Новосибирска* / Под ред. И.Ю. Коропачинского. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2008. – 303 с.
13. Бакулин В.Т. Тополь черный в Западной Сибири. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. – 121 с.
14. Бакулин В.Т. Тополь душистый в Сибири. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2010. – 110 с.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 2. – P. 473–497.



16. Winton L.L. Shoot and tree production from aspen tissue cultures // Amer. J. Bot. – 1970. – Vol. 57, № 8. – P. 904–909.
17. Simola L. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea* // Scientia Hortic. – 1985. – Vol. 26. – P. 77–85.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – 352 с.
19. Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход. Пер. с англ. – М., 1985. – 304 с.
20. Ide Y., Nishikawa H. In vitro propagation of *Betula schmidtii* from germinated seedlings // Bull. Tokyo Univ. For. – 1993. – Vol. 89. – P. 163–169.

EFFECTIVE WAY OF SHOOTS REGENERATION OF THE POPLAR BUDS AND LEAVES

A.A. Erst

V.T. Bakulin

*Central Siberian Botanical Garden,
Siberian Branch of Russian Academy
of Sciences, 101, Zolotodolinskaya St.,
Novosibirsk, 630090, Russia*

E-mail: annaerst@yandex.ru

Axillary buds and leaves of four elite hybrids and two species of poplar have been used as initial explants for clonal micropropagation. The ways of morphogenesis have been revealed: a direct (adventive shoot formation, the development of axillary buds) and indirect (gamogenesis). The response of explants proved to be dependent upon the genotype of the parent plant. The best morphogenic response was characteristic of *Populus nigra* and *P. alba* (80 and 72% respectively). The key factor for the development of shoots from callus culture was entering GA₃ into the growth medium. The best medium at the stage of multiplication of shoots was MS + BAP 1 μM + 5 μM GA₃. Microshoots obtained directly and indirectly have been rooted successfully on half-strength MS medium.

Keywords: poplar, hybrids, leaves, buds, propagation *in vitro*.