

УДК 631.527:581.143.6

РАЗРАБОТКА ПРИНЦИПОВ ОТБОРА ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ГИБРИДОВ, ФОРМ И КЛОНОВ ТОПОЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

О.О. Жолобова, И.В. Могилевская, Т.В. Терещенко, А.М. Пугачёва, А.В. Солонкин
ФНЦ агроэкологии РАН, Волгоград, Россия

Защитные лесные насаждения из быстрорастущих и устойчивых к абиотическим стресс-факторам видов, гибридов и форм древесных пород необходимо создавать на основе новых, адаптированных к засухе и экстремальным условиям генотипов. Культура изолированных органов и тканей in vitro позволяет в лабораторных условиях проводить часть прикладных и фундаментальных исследований. Целью нашего исследования являлась разработка принципов отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре in vitro для ускоренного селекционного процесса. Новые генотипы тополей были получены после целенаправленного скрещивания отобранных родительских линий с использованием культуры изолированных зародышей из незрелых семенных коробочек. Для массового размножения полученных генотипов выбрана питательная среда по протоколу Murashige and Skoog, дополненная цитокинином метатополин в концентрации 0,2 мг/л. Хотя для размножения конкретного генотипа после отбора на устойчивость к засухе необходимо целенаправленно провести подбор оптимального состава питательной среды, т.к. регенерационная способность эксплантов носила ярко выраженный генотипический характер. Использование полиэтиленгликоля 6000 оказалось эффективным для моделирования водного дефицита в культуре in vitro и отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* для дальнейших полевых испытаний.

Ключевые слова: *Populus*, микроклональное размножение, полиэтиленгликоль, осмотический стресс, засухоустойчивые генотипы

DEVELOPMENT OF PRINCIPLES OF SELECTION OF DROUGHT-TOLERANT HYBRIDS, FORMS AND CLONES OF POPLAR IN CULTURE IN VITRO

O.O. Zholobova, I.V. Mogilevskaya, T.V. Tereshchenko, A.M. Pugacheva, A.V. Solonkin
FSC Agroecology RAS, Volgograd, Russia

Protective forest plantations of fast-growing and resistant to abiotic stress factors species, hybrids and forms of tree species must be created on the basis of new genotypes adapted to drought and extreme conditions. The culture of isolated organs and tissues in vitro makes it possible to carry out some applied and fundamental research in the laboratory. The purpose of our research was to develop principles for selecting drought-resistant hybrids, forms and clones of poplars in in vitro culture for an accelerated breeding process. New poplar genotypes were obtained after targeted crossing of selected parental lines using the culture of isolated embryos from immature seed pods. For mass propagation of the obtained genotypes, a nutrient medium was selected according to the Murashige and Skoog protocol, supplemented with the cytokinin metatopolin at a concentration of 0.2 mg/l. Although for the propagation of a specific genotype after selection for resistance to drought, it is necessary to purposefully select the optimal composition of the nutrient medium, because the regenerative ability of explants had a pronounced genotypic character. The use of polyethylene glycol 6000 was effective in simulating water stress in in vitro culture and selecting drought-tolerant *Populus* genotypes for further field trials.

Keywords: *Populus*, micropropagation, polyethylene glycol, osmotic stress, drought-resistant genotypes

На территориях с засушливым климатом и нарастающими очагами опустынивания очень остро стоит вопрос о создании орошаемых площадей и увеличению количества зеленых насаждений. Защитные лесные насаждения из быстрорастущих и устойчивых к абиотическим стресс-факторам видов, гибридов и форм древесных пород, в том числе и представителей рода *Populus*, необходимо создавать на основе новых, адаптированных к засухе и экстремальным условиям генотипов [4].

В последние годы селекционеры используют в своей работе новейшие технологии, основанные на достижениях в области геномики, эпигенетики и микроразмножения, которые способны значительно ускорить селекционный процесс [6]. Создаются коллекции ценного генофонда лиственных древесных пород в культуре *in vitro* для проведения прикладных и фундаментальных исследований [3]. Клеточная селекция *in vitro*, позволяющая проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками, основана на общих механизмах устойчивости, как для целых растений, так и для изолированных клеток [2]. Данный метод позволяет не только экономить время и ресурсы при создании доноров устойчивости, но и ускорить оценку селекционного материала.

ВНИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии разработал биотест-систему на основе каллусных культур *in vitro* для отбора засухоустойчивых форм сосны обыкновенной [1]. Большим генетическим разнообразием в их коллекции микроклонов представлены рода *Populus* и *Betula*, которые протестированы на устойчивость к засолению *in vitro* [5].

Целью нашего исследования являлась разработка принципов отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре *in vitro* для ускоренного селекционного процесса.

Гибридные формы тополей были получены от целенаправленного скрещивания на срезанных ветвях отобранных родительских линий в коллекции ФНЦ агроэкологии РАН: Тополь дельтовидный (*Populus deltoids*) ♀ × Тополь белый (*Populus alba*) ♂ (F1-3) и Тополь черный пирамидальный (*Populus nigra f. pyramidalis*) ♀ × Тополь белый (*Populus alba*) ♂ (F1-5). Из незрелых зеленых семенных коробочек в асептических условиях были изолированы зародыши, которые помещались в культуральную среду, вдвое обедненную макро- и микроэлементами по протоколу Murashige and Skoog (MS) [8]. Для полученных генотипов были подобраны питательные среды для размножения в культуре *in vitro*, дополненные цитокининами: 6-бензиламинопурином (6-BA), метатополлином (Mt), кинетином (Kinetin). В качестве контроля использовали безгормональную питательную среду (MS контроль).

Для моделирования осмотического стресса в культуре *in vitro* с целью проведения отбора засухоустойчивых генотипов тополей использовали полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ 6000). Данный полимер с высокой молекулярной массой представляет собой инертный осмотический компонент, снижающий водный потенциал питательных растворов, не проникающий в растительные ткани и не оказывающий на них токсичное действие [7].

В результате проведенных исследований, на этапе введения в асептическую культуру изолированных зародышей из незрелых зеленых семенных коробочек было получено 55 генотипов от двух линий скрещивания. В эксперименте по подбору питательных сред для размножения использовали 7 генотипов и 6 концентраций цитокининов с контрольной средой MS. После 6 недель культивирования были зафиксированы различия по длине побега как в зависимости от гормонального состава среды, так и от генотипической реакции (рис. 1). Было отмечено, что среди трех генотипов от скрещивания F1-3, значения средней длины побега на всех питательных средах находились в примерно равном числовом диапазоне и почти не имели статистически значимых различий как между контрольной средой и средами с цитокининами, так и между различными концентрациями самих гормонов.

Для генотипов F1-5 добавление в питательную среду гормонов цитокининовой природы положительно повлияло на длину микропобегов, которая возросла в 3,4 раза у генотипа g6 на среде с Mt 0,2 по сравнению с контролем или в 2 раза и выше у генотипа g3 на средах с гормонами по сравнению с контролем (рис. 1).

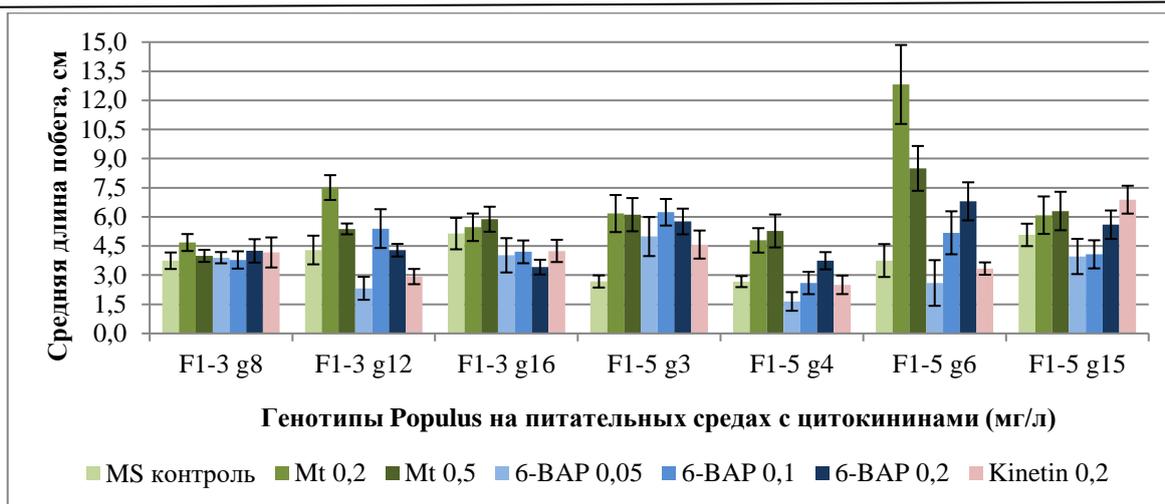


Рисунок 1. Генотипические различия длины микропобегов гибридов *Populus* при культивировании на питательных средах, дополненных цитокининами.

Примечание: MS контроль – безгормональная питательная среда; Mt 0,2 – метатополин 0,2 мг/л; Mt 0,5 – метатополин 0,5 мг/л; 6-BAP 0,05 – 6-бензиламинопурин 0,05 мг/л; 6-BAP 0,1 – 6-бензиламинопурин 0,1 мг/л; Kinetin 0,2 – Кинетин 0,2 мг/л.

В целом, для всех генотипов эффективным гормоном для размножения оказался метатополин (Mt 0,2) в невысоких концентрациях, который оказывал стимулирующее действие на рост микропобегов, не нарушая морфологические характеристики листовых пластин, междоузлий и самих побегов.

Использование 6-BAP в минимальных концентрациях от 0,05 до 0,2 мг/л для большинства исследуемых генотипов положительно влияло на образование новых микропобегов, значительно увеличивая коэффициент размножения (рис. 2 В) по сравнению с контролем (рис. 2 А).

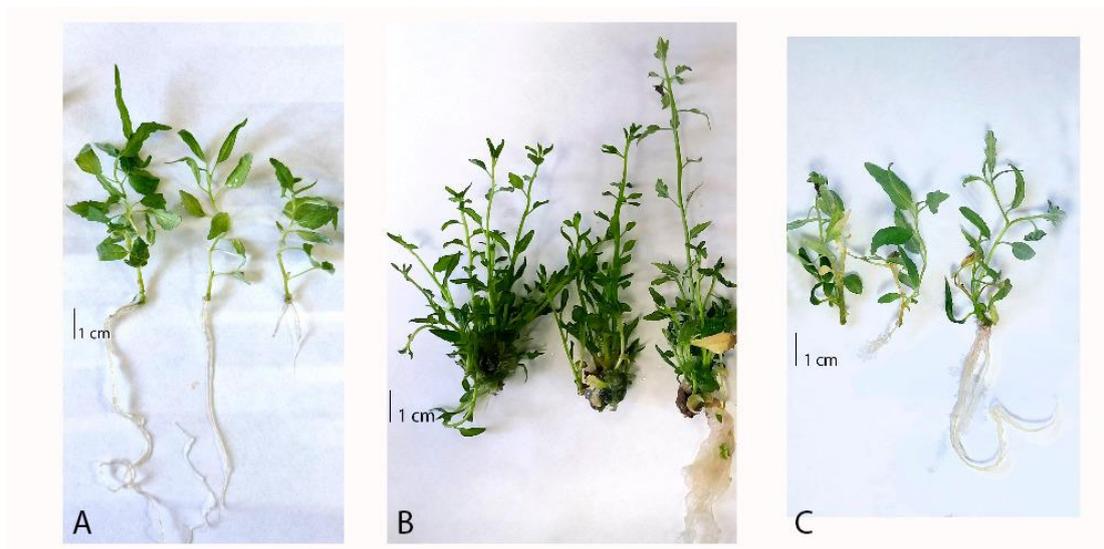


Рисунок 2. Микропобеги гибрида *Populus* F1-5 g3 на экспериментальных питательных средах: А – MS контроль, В – 6-BAP 0,1 мг/л; С – Kinetin 0,2 мг/л.

Количество побегов на эксплант варьировало от 15 до 30 вновь образованных микропобегов, но при этом активно развивались процессы витрификации, влияющие на дальнейшую регенерационную способность. Гипергидратация микропобегов, приводящая к морфологическим изменениям тканей, провоцировала гибель большей части эксплантов при последующем субкультивировании. Применение кинетина в концентрации 0,2 мг/л не повлияло

на изменение морфометрических характеристик микропобегов *Populus*, и было статистически незначимым по сравнению с контролем (рис. 2 С).

Моделирование водного дефицита в условиях *in vitro* с использованием неионного осмотика полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 оказалось эффективным при создании приближенных условий к засухе. Для построения дозовой кривой и определения сублетальных и летальных концентраций ПЭГ был заложен эксперимент с 5 генотипами тополей на культуральных средах с ПЭГ в концентрациях от 10 до 70 г/л. Выделены две концентрации ПЭГ 40 и 60 г/л для проведения массового отбора на устойчивость к осмотическому стрессу 55 генотипов тополей.

Таким образом, в результате проведенных исследований были разработаны основные принципы отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* в культуре *in vitro*. Использование культуры изолированных зародышей из незрелых семенных коробочек является эффективным способом получения исходного гибридного материала после целенаправленного скрещивания на срезанных ветвях. Метатополин в концентрации 0,2 мг/л в культуральной среде проявлял стимулирующее действие для массового размножения полученных генотипов, хотя для размножения конкретного генотипа после отбора на устойчивость к засухе необходимо целенаправленно провести подбор оптимального состава питательной среды, т.к. регенерационная способность эксплантов носила ярко выраженный генотипический характер. Использование полиэтиленгликоля оказалось эффективным для моделирования водного дефицита в культуре *in vitro* и отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* для дальнейших полевых испытаний.

Благодарности. Исследование проводилось за счет средств государственного научного гранта Волгоградской области в форме субсидии для реализации проекта «Разработка принципов селективного отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре *in vitro*» № 124012200177-7

Библиографический список

1. Аминова Е. Ю., Табацкая Т. М., Машкина О. С., Попов В. Н. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2017. № 1. С. 14–22.
2. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт. 2020. 333 с
3. Корчагин О. М., Табацкая Т. М., Машкина О. С. Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор) // Лесохозяйственная информация. 2023. № 2. С. 75–90.
4. Морозова Е.В., Иозус А.П. Особенности сортоиспытания перспективных для защитного орошаемого и богарного лесоразведения видов, гибридов и форм тополей в условиях сухой степи Нижнего Поволжья // Успехи современного естествознания. 2016. № 11-2. С. 306–310.
5. Табацкая Т. М., Аминова Е. Ю., Машкина О. С. Биотехнологическая оценка коллекционного материала березы и тополя в условиях солевого стресса в культуре *in vitro* // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. 2020. С. 190–191.
6. Тараканов В. В., Паленова М. М., Паркина О. В., Роговцев Р. В., Третьякова Р. А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) // Лесохозяйственная информация. 2021. № 1. С. 100–143.
7. Hassan N. M., Serag M. S., El-Feky F. M. Changes in nitrogen content and protein profiles following *in vitro* selection of NaCl resistant mung bean and tomato // Acta Physiologiae Plantarum. 2004. Т. 26. Р. 165–175.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 3. Р. 473–497.