

УДК 630*161.443.6 + 674.031.632.13

Технология долгосрочного хранения в культуре *in vitro* ценных генотипов березы и выращивание на ее основе посадочного материала

© 2019 О.С. МАШКИНА^{1,2,*}, Т.М. ТАБАЦКАЯ¹, Н.И. ВНУКОВА¹

¹ФГБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж 394087

²ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж 394018

*e-mail: mashkinaos@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 11.05.2019 г.

Описана технология долгосрочного хранения *in vitro* (не менее 27 лет) ценных генотипов березы в стандартных условиях культивирования (25 °С, 2,0 клк, 16 ч день/8 ч ночь) и при пониженной положительной температуре (+4 °С, 0,5 клк, 6 ч день/18 ч ночь) с использованием питательных сред без гормонов. Впервые исследовано влияние условий хранения коллекционных клонов *Betula pubescens* и *B. pendula* var. *carelica* (на примере шести генотипов) на регенерационную способность коллекционных образцов, адаптивный потенциал растений-регенерантов и на рост посадочного материала *in vitro* и *ex vitro*. Установлено, что оба режима хранения обеспечивают стабильно высокую выживаемость культур (82–100%), регенерационную способность (коэффициент мультипликации 4,2–6,3, ризогенная активность 90–100%) микрочеренков *in vitro*. Отмечено сохранение особенностей роста клонов в высоту в условиях *in vitro* и *ex vitro*, их внутриклоновая однородность по росту, отсутствие признаков соматклональной изменчивости. На этапах мультипликации и перевода растений в теплицу выявлены значительные межвидовые различия. Наиболее высокий процент адаптированных растений (75–98% в зависимости от генотипа клона) получен при прямой высадке микрорастений в теплицу, которая упрощает технологию и делает ее менее затратной при выращивании посадочного материала.

Ключевые слова: долгосрочное хранение *in vitro*, береза, вид, генотип, микроразмножение, адаптация *ex vitro*, посадочный материал

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-57-67

Сохранение лесных генетических ресурсов является актуальной проблемой современности. В этой связи ФАО (FAO, Food and Agriculture Organization) призывает все страны к расширению исследований по сохранению и устойчивому управлению мировыми лесными генетическими ресурсами, которые в последние годы подвергаются все возрастающему давлению со стороны антропогенных, климатических и дру-

гих факторов¹. Генетическое разнообразие лесных древесных растений имеет большое биологическое значение, в частности, для повышения их устойчивости и адаптационной способности, и в практической деятельности – для селекции и улучшения качества лесных видов. Международный институт генетических ресурсов растений² координирует работу научных центров по сохранению культур.

Список сокращений: ½ MS – среда Мурагиге-Скуга с половинным содержанием макро-солей; 6-БАП – 6-бензиламинопурин.

¹Состояние лесных генетических ресурсов в мире. Комиссия по генетическим ресурсам растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства, CGRFA/WG-FGR-1/11/2 / ФАО, 2014. <http://www.fao.org/3/a-i3827r.pdf>

²International Plant Genetic Resources Institute. Global Strategy for Plant Conservation http://www.bgci.org.uk/files/7/0/global_strategy.pdf

К современным технологиям сохранения (консервации *ex situ*) и воспроизводства носителей ценного генофонда относится лесная биотехнология, которая нашла широкое применение во всем мире, в том числе в России [1–6], и поддерживается рядом программных документов Российской Федерации³. В плане мероприятий на 2018–2020 гг. «Развитие биотехнологий и генной инженерии»⁴ (дорожная карта) особое внимание уделяется созданию коллекций *in vitro* лесных древесных растений. Формирование биокolleкций базируется на завершенных технологиях клонального микроразмножения и осуществляется с помощью различных подходов. Образцы (изолированные клетки, ткани, отдельные органы, микропобеги или микрорастения) могут храниться в виде нормально растущей коллекции, в условиях замедленного роста при пониженной температуре, с добавлением в питательную среду веществ, лимитирующих ростовые процессы или при полной остановке роста (криосохранение).

Такие коллекции формируют также с целью воспроизводства (ускоренного массового клонирования *in vitro* и получения посадочного материала) экономически ценных и уникальных генотипов; проведения методических, прикладных и фундаментальных исследований в области лесной генетики, селекции и биотехнологии.

Одна из первых в России коллекция *in vitro* клонов ценных генотипов лесных древесных растений начала формироваться нами (в виде микрорастений) в 1991 г. К настоящему времени она включает >60 клонов быстрорастущих, продуктивных, устойчивых и декоративных гибридов, сортов и полиплоидов березы, тополя, осины и ивы [7–9]. Длительность хранения образцов в коллекции – от 4 до 27 лет. Большинство из них трудно размножаются обычным черенкованием, а отдельные генотипы по разным причинам уже отсутствуют в природе. Ежегодно коллекция пополняется новыми клонами с расширением видового и породного состава. В 2014 г. коллекция получила официальный статус, а в 2018 г. была зарегистрирована на сайте «Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации» (<http://скр-рф.ru/usu/569228/>). Кроме того, на базе ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» в 2013 г. создан «Центр

лесных биотехнологий», одна из основных задач которого – поддержка работ, направленных на сохранение лесных генетических ресурсов, в том числе селекционных достижений (<http://www.vniilgisbiotech.ru>).

Коллекции клонов *in vitro* элитных генотипов лесных древесных растений позднее были созданы и в других институтах России [10–12].

Несмотря на значительные успехи в этой области, еще недостаточно изучено влияние условий хранения *in vitro* живой коллекции лесных древесных растений на регенерационную способность коллекционных образцов, адаптивный потенциал растений-регенерантов при переводе их в нестерильные условия (*ex vitro*) после длительного хранения. Изучение этого вопроса очень важно для разработки эффективной технологии долгосрочного сохранения коллекции различных генотипов *in vitro*, пригодной для выращивания посадочного материала и создания лесных культур целевого назначения.

Цель настоящего исследования – оценка влияния способа хранения *in vitro* коллекционных образцов клонов ценных генотипов березы на их регенерационную способность, адаптивный потенциал *in vitro* и *ex vitro*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

Исходным материалом для проведения опытов *in vitro* служили береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) и береза карельская (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti). Выбор объектов обусловлен тем, что отобранные клоны березы пушистой (2пш, 3пш, бпш) отличаются быстрым ростом и высокой продуктивностью, а клоны карельской березы (1а, 18к, Ап) – декоративной узорчатой текстурой древесины. Кроме того, карельская береза, являющаяся разновидностью березы повислой (*Betula pendula* Roth), в настоящее время находится на грани исчезновения, поэтому проблема сохранения ее генетических ресурсов, а также вегетативного размножения наиболее ценных форм стоит особенно остро [10, 13, 14].

³Комплексная программа «Развитие биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» (БИО 2020). Постановление Правительства РФ №1853п-П8 от 24 апреля 2012 г. http://economy.gov.ru/wps/wcm/connect/2c9d7d804b0988f09b2a9ba338dd8a95/biotechdevelopcomprog_2020.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=2c9d7d804b0988f09b2a9ba338dd8a95

⁴План мероприятий («дорожная карта») «Развитие биотехнологий и генной инженерии». Распоряжение Правительства РФ №337-п от 28 февраля 2018 г. <http://static.government.ru/media/files/v6MiUgQdmSRpmUebtv8Aqzk2KdmZ76Cl.pdf>

Получение клонов *in vitro*, их длительное хранение и микроразмножение

Экспланты исходных взрослых деревьев (35–40 лет) были однократно, но в разные годы введены в культуру *in vitro*. Из них, по разработанной методике [7, 8], регенерировали растения, которые затем длительно поддерживали *in vitro* в различных климатических режимах.

В работе использовали по 20–30 регенерантов для каждого из шести клонов березы, поддерживаемые в составе коллекции *in vitro* двумя способами: в стандартных условиях культивирования (при температуре 25 ± 2 °С, фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь, освещенности 2,0 клк) и при пониженной положительной температуре ($+4 \pm 1$ °С), слабой освещенности (0,5 клк), коротком фотопериоде (6 ч день/18 ч ночь). Длительность хранения *in vitro* клонов составила 4 года (2пш, 3пш, бпш), 20 лет (Ап) и 27 лет (Ia, 18к).

Регенерацию растений в культуре *in vitro* осуществляли путем прямой выгонки пазушных побегов из одноузловых стеблевых сегментов или через каллусные культуры (для клонов Ia и 18к березы карельской). В обоих случаях в качестве индуктора морфогенеза использовали 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрации 0,5–1 мг/л. Инициацию развития пазушных побегов осуществляли на питательной среде MS [15] с добавлением 0,7% агара (AppliChem, США), 2% сахарозы (Panreac, Испания), 5 мг/л глицина (Вектон, Россия), 10 мг/л глутамин (Acros Organics, США), 100 мг/л мезо-инозита (Panreac, Испания), 2 мг/л тиамин, 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,5 мг/л никотиновой кислоты и 0,5 мг/л пиридоксин. Укоренение микропобегов, многолетнее хранение клонов *in vitro* и их последующее микроразмножение проводили на безгормональной питательной среде MS с половинным содержанием макроэлементов ($\frac{1}{2}$ MS). На всех указанных этапах культивирования и хранения *in vitro* использовали биологические пробирки (21×200 мм), в которые высаживали по одному микропобегу.

Для хранения клонов при различных условиях климатического режима отбирали предварительно укорененные микропобеги высотой 1,5–2 см.

При стандартных условиях культивирования (I способ хранения) осуществляли относительно редкое субкультивирование микрорастений на основе пролиферации пазушных меристем с интервалом один раз в 3–6 мес. согласно ранее разработанной методике [7]. При пониженной положительной температуре хранения (II способ хра-

нения) проводили субкультивирование с более редким интервалом (до 12 мес) на той же питательной среде $\frac{1}{2}$ MS без гормонов, но с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты (2 мг/л) [16]. После хранения при пониженной температуре возобновление роста и развития культур осуществляли в стандартных условиях культивирования в течение 1,5–2 мес. Сохранность (выживаемость) микрорастений после хранения *in vitro* определяли как процент жизнеспособных культур к общему числу высаженных.

Для получения посадочного материала проводили многократное микрочеренкование растений соответствующего клона с более коротким интервалом (раз в 1,5–2,0 мес против 3–12 мес при долгосрочном хранении) на безгормональной питательной среде $\frac{1}{2}$ MS, дополненной активированным углем (2%), в стандартных условиях культивирования.

Влияние различных способов хранения *in vitro* одних и тех же клонов березы на эффективность микроразмножения и получение посадочного материала оценивали по проценту микрочеренков, образовавших побеги и корни *in vitro*, а также по росту побегов в высоту и их мультипликационной активности.

Внутриклоновую однородность оценивали по росту растений в высоту, а также по косвенным показателям – коэффициенту мультипликации (который зависит от высоты растений, длины междоузлий), коэффициенту вариации. Коэффициент мультипликации, характеризующий регенерационный потенциал коллекционных образцов, рассчитывали как количество микрочеренков от одного побега *in vitro*. Оценку соматоклональной изменчивости у микрорастений, возобновившихся после хранения в условиях *in vitro*, и у растений-регенерантов в теплице (*ex vitro*) проводили визуально по морфологическим признакам (хлороз, аномалии листьев (изменение формы, размера, цвета), аномальные и некротические побеги, отсутствие корней и др.).

Адаптация микроклональных растений березы к условиям *ex vitro*

Испытаны два способа адаптации растений-регенерантов к условиям теплицы (*ex vitro*): поэтапный, с предварительным их выращиванием в условиях лаборатории (1-й способ) и прямой, с посадкой микрорастений непосредственно в теплицу (2-й способ). В обоих случаях сначала проводили предварительную акклиматизацию микрорастений к условиям климатической камеры

в течение 2–3 сут на агаровой среде в открытых культуральных сосудах с добавлением в них 1,0–1,3 мл дистиллированной нестерильной воды.

При поэтапной адаптации растения высаживали в пластиковые контейнеры объемом 1 л (по 10 растений в каждый), наполовину заполненные субстратом на основе верхового нейтрализованного торфа – торф с перлитом или торф с вермикулитом в соотношении 1:1. Для предупреждения развития инфекции поверхность субстрата присыпали песком, прокаленным при 200 °С. Условия выращивания – температура 20±2 °С, фотопериод 16 ч, интенсивность освещения 1,5 клк. Состав почвенного субстрата на грядках теплицы – песок : верховой нейтрализованный торф (Велторф, Россия) в соотношении 1 : 1. Субстрат перед посадкой обрабатывали слабым раствором перманганата калия.

Для высадки в грунт отбирали микрорастения с хорошо развитой корневой системой, прямым стволиком, высотой от 3 до 5 см. При высадке растений в грунт из контейнеров или из пробирок корни обрабатывали мелкоизмельченным активированным углем. Высадку осуществляли в мае-июне в теплицу без туманообразующей установки. Повышенную влажность (80–90%) обеспечивали дополнительным временным укрытием (дуго, покрытые полиэтиленом, высотой до 40 см), которое одновременно удешевляло данную процедуру. Через 10–14 дней укрытие снимали, постепенно переходили на более редкий полив. Приживаемость растений-регенерантов учитывали через четыре недели после высадки в грунт как процент прижившихся растений к общему числу высаженных. Высоту растений измеряли в конце вегетационного сезона.

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета программ «Stadia – 7.0». Достоверность различий средних значений определяли по критерию Стьюдента. Представлены средние значения из трех опытов, каждый из которых включал не менее 20 культур на вариант.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определенные нами ранее режимы хранения коллекции *in vitro* (стандартные условия культивирования или пониженная температура) достаточно универсальны и воспроизводимы, что обеспечило их успешное использование для разных

генотипов березы. Их апробация на 11 клонах березы (карельской, повислой, далекарлийской и пушистой) подтвердила эффективность сохранности при долгосрочном хранении *in vitro* [17].

Следует отметить, что в целом сохранность (выживаемость) микрорастений при обоих режимах хранения была стабильно высокой (82–100%) и существенно не изменялась по годам исследований. Однако интервал субкультивирования микрорастений в режиме «хранение» в значительной степени зависел от их генотипических особенностей (в частности, видовой принадлежности клонов). Так, все три клона карельской березы (18к, Ап и Ia) в стандартных условиях культивирования выдерживали относительно редкое (один раз в 5–6 мес) субкультивирование, демонстрируя высокие показатели сохранности (89–100% жизнеспособных растений). Для достижения таких же высоких значений выживаемости для клонов березы пушистой (2пш, 3пш, бпш), интервал субкультивирования должен быть сокращен до 3–4 мес. Аналогичная тенденция прослеживалась для тех же клонов при хранении в условиях пониженной температуры. Оптимальный беспересадочный интервал хранения микрорастений березы карельской составил 12 мес (100%-ная сохранность растений, способных к полному восстановлению в стандартных условиях), а березы пушистой – не более 6 месяцев (сохранность растений 80–100%).

В настоящей работе клоны березы карельской и березы пушистой, находящиеся в виде микрорастений, были протестированы в различных условиях хранения на эффективность их микроразмножения *in vitro* и адаптивную способность *ex vitro* с целью выращивания качественного посадочного материала.

Долгосрочное хранение культур можно считать успешным, если их ростовые особенности, жизнеспособность, регенерационный потенциал сохраняются и при микроразмножении *in vitro*. Независимо от способа хранения микрорастений березы в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения микрочеренки имели высокую ризогенную активность *in vitro* (укореняемость составила 90–100%), нормальное развитие (87–95% одноузловых эксплантов сформировали хорошо развитый основной пазушный побег), не имели признаков соматоклональной изменчивости микрорастения (рис. 1а–д).

В условиях проведенного эксперимента видовые особенности березы оказали более существенное влияние на рост и мультипликационную

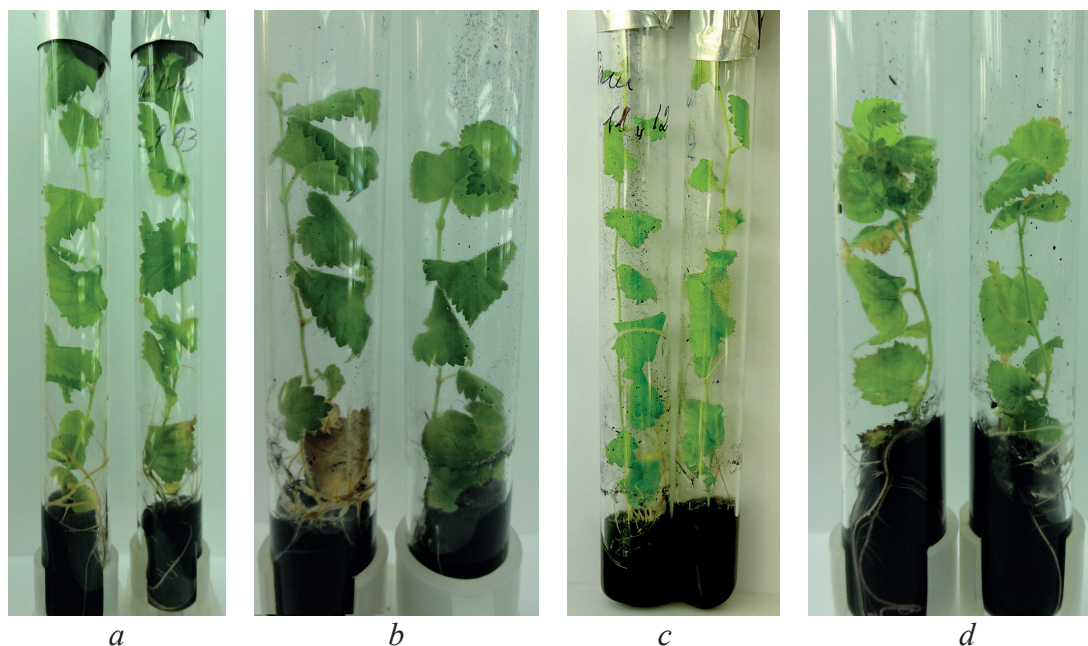


Рис. 1. Общий вид 2-месячных микрорастений березы пушистой (a, c) и березы карельской (b, d) на этапе микроразмножения после хранения в стандартных условиях культивирования (a, b) и при пониженной температуре (c, d) и особенности корневой системы карельской березы (клон 18к) на питательной среде 1/2MS с активированным углем (e) и без него (f)

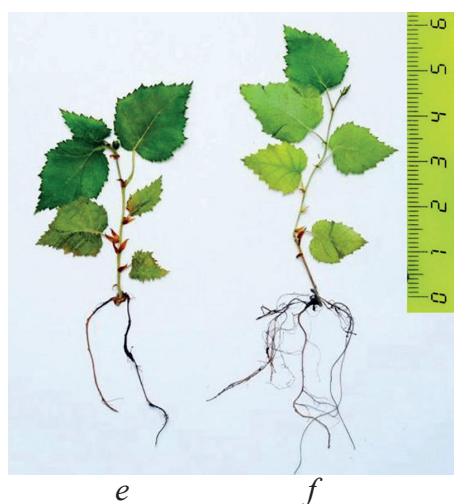


Fig. 1. General view of 2-month-old micro plants of *B. pubescens* (a,c) and *B. pendula* var. *carelica* (b,d) at the stage of micropropagation after *in vitro* storage under normal conditions (a,b) and at low temperature (c,d); root system structure of Karelian birch (clone 18k) on a 1/2 MS nutrient medium with (e) and without (f) activated carbon

активность растений в культуре *in vitro* по сравнению с особенностями изученных клонов в пределах вида (рис. 2).

Это позволило нам усреднить данные отдельно для березы карельской и березы пушистой (табл. 1). Число укорененных микрочеренков учитывали через 1 мес., а высоту побегов – через 1,5 мес культивирования. Микрорастения клонов березы пушистой характеризовались в условиях *in vitro* более интенсивным ростом побегов в высоту (в 1,4–1,5 раза), чем карельской березы (табл. 1). Так, после хранения березы пушистой при пониженной температуре средняя высота растений через 1,5 мес. микрочеренкования составила 6,3 см (с варьированием от 5,3 до 9,3 см у отдельных растений), а у березы карельской 4,2 см (3,1–6,1 см) соответственно. Причем, клоны стабильно сохраняли свои ростовые особенности при повторных циклах микрочеренкования

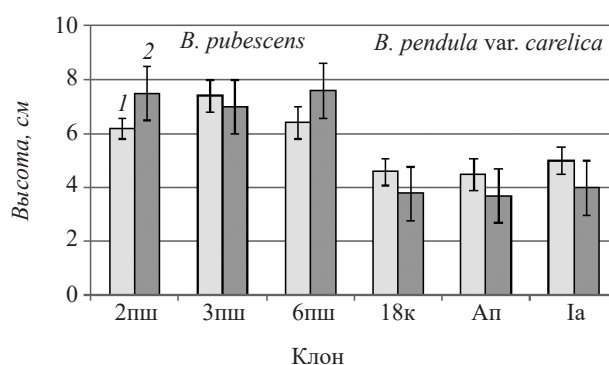


Рис. 2. Высота 1,5-месячных микрорастений различных клонов березы пушистой и березы карельской на этапе микроразмножения после хранения в стандартных условиях культивирования (1) и при пониженной температуре (2). Обозначения клонов см. в тексте

Fig. 2. The height of 1.5-month-old micro plants of different clones of *B. pubescens* and *B. pendula* var. *carelica* at the stage of micropropagation after *in vitro* storage under normal conditions (1) and at low temperature (2)

Эффективность микрочеренкования культур березы на безгормональной питательной среде ½ MS при различных способах их хранения *in vitro*

Efficiency of micrografting of betula on hormone-free ½ MS macro salt nutrient medium depending on *in vitro* storage method

Вид	Количество микрочеренков, %		Высота побега, см		Коэффициент мультипликации
	образовавших побег	укорененных	среднее (min–max)	с.в., %	
I способ хранения					
<i>B. pubescens</i>	91,7±5,3	96,3±3,2	6,5±0,1* (5,0–7,8)	12,4	5,8±0,3*
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	86,7±5,6	94,2±2,1	4,7±0,1 (3,8–5,8)	12,1	4,2±0,1
II способ хранения					
<i>B. pubescens</i>	95,3±1,0	94,3±1,0	6,3±0,2* (5,3–9,3)	18,4	6,3±0,2*
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	92,3±1,0	93,3 1,0	4,2±0,1 (3,1–6,1)	13,8	4,2±0,1

Примечание: для каждого вида березы представлено среднее значение из трех клонов. Количество укорененных микрочеренков учитывали через 1 мес., а высоту побегов – через 1,5 мес культивирования; с.в. – коэффициент вариации.

*Различия с *B. pubescens* достоверны при $p < 0,001$

Note: For each birch species we took the average value for the three clones. The number of successful micrografts was registered after one month, the shoots height – after 1,5 months of cultivation. (c.v.), stands for coefficient of variation.

(*), the differences with *B. pubescens* are statistically significant at $p < 0,001$.

(субкультивировании). При обоих способах хранения коллекционных образцов отмечены внутриклоновая однородность по росту (коэффициент вариации 12–18%) и нормальный морфотип растений.

Для снижения вероятности микробной контаминации культур и повышения их сохранности при долгосрочном хранении, возобновлении и первых циклах клонирования *in vitro* в качестве культуральных сосудов использовали биологические пробирки, в которые высаживали по одному микрочеренку. Микрорастения были хорошо развиты и имели выраженные междоузлия (рис. 1), что благоприятно для микрочеренкования побегов. Это позволило нам заготавливать для укоренения микрочеренки со всего побега, а не только верхушки побегов, как это часто делают при мультипликации густо посаженных и истонченных растений в пластиковых контейнерах [18]. Коэффициент мультипликации составил в зависимости от генотипических особенностей клонов от 4,2 до 6,3, что находится в пределах нормы для березы [18].

Нередко для хранения и укоренения микропобегов в питательную среду добавляют регуляторы роста ауксиновой природы [2, 19]. Однако, как показывают наблюдения, длительное использование ауксинов нежелательно из-за большой вероятности образования каллусной ткани у основания микропобегов, наличие которой препятствует успешному укоренению для последующего перевода растений в нестерильные условия (*ex vitro*). Кроме того, даже оптимальный уровень растительных

гормонов при их продолжительном использовании часто приводит к соматоклональной (в том числе эпигенетической) изменчивости растений [20].

В наших исследованиях безгормональная питательная среда ½MS, дополненная активированным углем (2%), обеспечивала высокий уровень спонтанного укоренения (80–100% в зависимости от клона) и хороший рост побегов в высоту (рис. 1e). Однако на питательных средах без активированного угля качество корневой системы (развитие корней первого и второго порядка) было заметно выше (рис. 1f), что благоприятно сказывалось на адаптации растений *ex vitro*. Учитывая это, перед посадкой растений в почву, активированный уголь, включающий нерастворимые в воде механические частицы, уплотняющие агаризованную питательную среду, исключали, что, по-видимому, увеличивало аэрацию и способствовало формированию корней второго порядка.

Таким образом, что оба режима хранения (стандартные условия культивирования и пониженная температура) в условиях *in vitro* были эффективны, имели сходные результаты: стабильно высокую сохранность культур и регенерационную способность растительного материала длительного срока хранения, особенности роста клонов в высоту и внутриклоновую однородность по росту.

Перевод растений из асептических условий в почву является одним из уязвимых и трудоемких этапов выращивания посадочного материала.



Рис. 3. Акклиматизация растений-регенерантов березы пушистой (клон 3пш) в условиях *ex vitro* после их длительного хранения *in vitro*: *a* – предварительная высадка в лаборатории; *b* – прямая высадка растений из культуральных сосудов в теплицу

Fig. 3. Acclimatization of *in vitro* propagated plants of *B. pubescens* (clone 3) to *ex vitro* conditions after long-term *in vitro* storage: provisional (in the lab, *a*), and direct (straight from a test tube to the greenhouse, *b*)

Это обусловлено целым рядом причин. В условиях *in vitro* формируется специфический культуральный фенотип, отличающийся анатомическими и физиологическими характеристиками от обычных растений и носящий приспособительный характер (снижение транспирации, слабое развитие сосудистой системы, обезвоживание корней на агаре, нарушение водного баланса и др.) [18, 21, 22]. Тонкий восковой налет (вплоть до его отсутствия), нарушение функций устьиц увеличивают скорость потери воды регенерантами в теплице в 3 раза [22]. Кроме того, успех адаптации микро-растений *ex vitro* во многом зависит от их генотипических особенностей, состава почвенного субстрата, температуры, влажности и др. [19, 22–24]. Трудности процесса адаптации объясняются и отсутствием универсальных технологий для акклиматизации, и низкой выживаемостью растений в течение периода акклиматизации [25]. Адаптацию клонированного *in vitro* материала лесных древесных растений чаще всего проводят в теплице с туманообразующей установкой, обеспечивающей высокую влажность (80–90%), с использованием смесей торфа с перлитом, песком, вермикулитом, почвой в различных соотношениях [23, 24, 26, 27].

Нами испытано два варианта перевода микро-растений березы в теплицу: поэтапный, с предварительной акклиматизацией растений в лабораторных условиях, и прямой, с высадкой микро-растений из культуральных сосудов сразу в теплицу (рис. 3).

При поэтапной высадке использовано два типа субстрата: торф+перлит (рис. 3*a*, слева) и торф+вермикулит (рис. 3*a*, справа). Показано, что оба варианта субстрата пригодны для предварительной акклиматизации растений в условиях лаборатории. Независимо от способа хранения коллекции *in vitro* приживаемость культур была высокой (100%). Пористая структура перлита (или вермикулита) способствовала нормализации водного баланса в субстрате, повышала его аэрацию, что положительно сказывалось на приживаемости и росте растений и давало сходные результаты для разных клонов (рис. 4). При обоих способах хранения коллекционных образцов отмечена высокая внутриклоновая однородность растений по росту (коэффициент вариации 11,8–14,2%). Причем, значимые различия по высоте растений (при $p < 0,001$) установлены на видовом уровне. Растения березы пушистой характеризовались более интенсивным ростом (в среднем 8,1 см с варьированием от 6,5 до 10,5 см) по сравнению с березой карельской (6,1 см, 4–8 см).

Прямая высадка микро-растений в почву теплицы является более простым и менее затратным способом их адаптации (отсутствует промежуточный этап акклиматизации, не используются дорогостоящие установки искусственного тумана). Эффективность прямой адаптации микро-растений, при которой частота акклиматизации была выше и составляла 80–100%, была подтверждена нами ранее на разных породах (береза, тополь, осина, ольха), видах и генотипах лиственных древесных растений [7–9, 28].

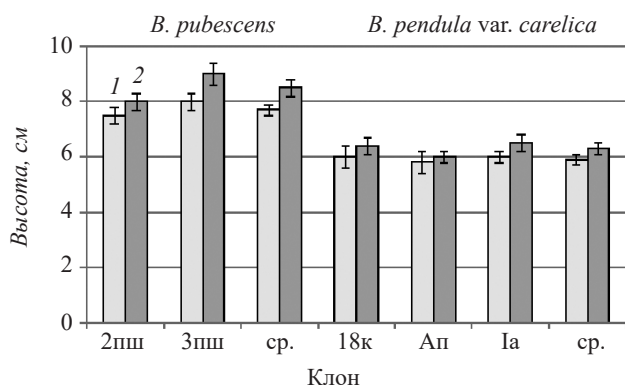


Рис. 4. Высота (1,5-месячных растений) клонов березы пушистой и березы карельской при предварительной адаптации в контейнерах в условиях лаборатории. Состав субстрата: торф+перлит (1), торф+вермикулит (2). ср. – среднее

Fig. 4. The height of 1.5-month-old clones of *B. pubescens* and *B. pendula* var. *carelica* at the stage of provisional adaptation in plant boxes under laboratory conditions. The substrate composition: peat+perlite (1), peat+vermiculite (2). (cp), stands for mean value

Независимо от способа хранения коллекции *in vitro* клоны березы в целом демонстрировали высокую (70–98%, в зависимости от генотипа) приживаемость в теплице (табл. 2). При этом наблюдалась сходная тенденция. Процент адаптированных растений-регенерантов при прямой высадке был выше (79,4–96,6%, у отдельных клонов 75–98%), чем при поэтапной (71,9–90,4%, у от-

дельных клонов от 70 до 92%). Наблюдаемые различия достоверны при $p < 0,01$. Возможно, это связано с легкой структурой субстрата, содержащем перлит или вермикулит, в результате чего при поэтапном способе пересадки (из культуральных сосудов в субстрат, а затем в теплицу) почвенный ком распадался и растения дважды испытывали стресс из-за повреждения корней. Растения-регенеранты

Таблица 2

Приживаемость и высота клонов березы в зависимости от способа их хранения в культуре *in vitro* и адаптации *ex vitro*

Survival rate and height of birch clones in the greenhouse depending on their *in vitro* storage method and *ex vitro* adaptation method

Способ адаптации в теплице	<i>B. pubescens</i>				<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>			
	2пш	3пш	6пш	Ср.	18к	Ап	Ia	Ср.
I способ хранения								
Поэтапный								
приживаемость, %	90,0	92,5	88,8	90,4±0,7*	70,5	72,7	72,4	71,9 ± 0,4
высота, см	10,2±0,5	11,9±0,7	10,6±0,7	10,9±0,4*	6,8±0,3	6,5±0,3	6,2±0,2	6,5±0,2
с.в., %	15,6	19,1	19,9	18,2	15,7	16,3	10,0	13,8
Прямой								
приживаемость, %	93,8	97,7	98,3	96,6±0,9*	83,3	75,0	80,0	79,4 ± 1,5
высота, см	12,1±0,6	12,6±0,6	11,8±0,7	12,2±0,3*	6,9±0,3	7,5±0,3	6,4±0,3	6,9±0,2
с.в., %	19,4	17,4	19,3	18,7	12,7	13,4	15,0	13,7
II способ хранения								
Поэтапный								
приживаемость, %	89,5	90,0	90,6	90,0 ± 0,2	73,4	70,6	83,9	76,0 ± 1,5
высота, см	9,3±0,4	9,8±0,4	9,6±0,4	9,7±0,3*	7,4±0,3	6,2±0,2	6,3±0,3	6,6±0,2
с.в., %	19,9	15,3	19,1	18,1	17,4	19,7	17,2	18,1
Прямой								
приживаемость, %	93,0	90,8	91,7	91,8 ± 0,4	93,1	91,1	91,6	91,9 ± 0,4
высота, см	9,4±0,5	10,0±0,5	10,4±0,4	9,9±0,3*	7,7±0,3	8,2±0,3	7,9±0,2	7,9±0,2
с.в., %	15,3	14,4	19,3	16,3	18,1	19,2	19,4	18,9

Примечание: Ср. – среднее, с. в. – коэффициент вариации.

*Различия между *B. pubescens* и *B. pendula* var. *carelica* достоверны в пределах каждого способа хранения и с прямой высадкой растений при $p < 0,01$.

Note: (cp.), stands for mean value, (s. v.), coefficient of variation.

(*), differences between *B. pubescens* and *B. pendula* var. *carelica* within each method of storage and with direct planting are statistically significant at $p < 0,01$.

не только хуже приживались, но и несколько отставали в росте по сравнению с прямой высадкой.

Независимо от способа хранения коллекции *in vitro* высаженные в теплицу растения характеризовались хорошим ростом и внутриклоновой однородностью (коэффициент вариации составил 10–20%) (табл. 2). Видовые особенности клонов оказали существенное влияние на рост растений. Причем, в теплице (*ex vitro*) сохранилась тенденция межвидовых различий, выявленная в условиях *in vitro*. Клоны быстрорастущих генотипов березы пушистой к концу вегетационного периода в 1,2–1,7 раз превосходили среднюю высоту клонов березы карельской (9,7–12,2 см против 6,5–7,9 см).

Результаты наших исследований показали, что оба способа длительного хранения коллекционных образцов *in vitro* могут быть использованы для сохранения ценных генотипов березы (консервации *ex situ*) и получения на их основе посадочного материала с целью создания плантационных культур целевого назначения. При I способе хранения (стандартные условия) микрорастения не испытывают стресс, в частности от пониженной температуры, как при II способе хранения [29]. Полное исключение гормонов из состава питательной среды снижает вероятность возникновения соматоклональной изменчивости и появление аномально развитых растений при длительном культивировании. Это обеспечивает получение качественного посадочного материала с сохранением у него хозяйственной и генетической ценности материнских деревьев. Понижение температуры и снижение интенсивности света (до полного его отсутствия) при II способе хранения приводят к значительному замедлению физиологических процессов, торможению роста растений, что позволяет увеличить интервал беспересадочного хранения. Добавление в питательную среду в повышенной концентрации (2,0 мг/л вместо 0,5 мг/л в норме) мощного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты – повышает выживаемость длительно хранящихся при пониженной температуре культур и обеспечивает их полное восстановление (активный рост и развитие). В литературе имеются сведения о том, что развитие проростков гречихи в темноте способствовало накоплению в них фенольных соединений (в том числе, фенилпропаноидов), которые являются компонентами антиоксидантной защиты клеток от различных стрессовых воздействий. Это, по мнению авторов, могло способствовать поддержанию жизнеспособности проростков в период их темнового развития [30].

Таким образом, разработанная нами технология, включающая два способа долгосрочного хранения *in vitro* коллекционных образцов (стандартные условия культивирования и пониженная температура), показала свою эффективность для разных генотипов березы карельской и березы пушистой. Основными условиями технологии являются: 1) использование безгормональных питательных сред на этапах хранения и получения посадочного материала, что снижает вероятность возникновения соматоклональной изменчивости и способствует сохранению генетической ценности клонируемого материала; 2) редкое субкультивирование (в зависимости от генотипических особенностей, 1 раз в 3–6 мес при I способе и в 6–12 мес при II способе) и регенерация на основе пазушных меристем; 3) снижение интенсивности света (0,5 клк, фотопериод 6 ч) и добавление в питательную среду аскорбиновой кислоты в повышенной концентрации (2,0 мг/л вместо 0,5 мг/л в норме) при II способе хранения, что повышает выживаемость культур при пониженной температуре и способствует их полному восстановлению. Экспериментально показано, что оба способа хранения коллекционных образцов обеспечивают стабильно высокую выживаемость и регенерационную способность культур *in vitro*. Сохраняются особенности роста клонов в высоту в условиях *in vitro* и *ex vitro*, их внутриклоновая однородность по росту. Всего в грунт теплицы было переведено более 1 тыс. микрорастений березы. Наиболее высокий процент адаптированных растений (75–98%, в зависимости от генотипических особенностей) получен при прямой высадке микрорастений в теплицу. Такой способ упрощает технологию и делает ее менее затратной при выращивании посадочного материала.

Результаты исследований подтверждают, что использование биотехнологических коллекций *in vitro* существенно повышает эффективность *ex situ*-консервации лесных генетических ресурсов и воспроизводства ценных и уникальных генотипов березы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Биотехнология: методы, технологии, перспективы. *Биотехнология*, 2008, (5), 3–22.
2. Концевая И.И. Длительное хранение микрорастений березы в культуре тканей. *Лесоведение*, 2009, (5), 50–56.
3. Cha-um S., Kirdmanee C. Minimal growth *in vitro* culture for preservation of plant species. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 2007, 1(1), 13–25.

4. Martin M.T., Pedranzani H.E., Sierra de Grado R. Behavior and preservation of an *in vitro* collection of European aspen in Spain. *Biocell*, 2007, 31(1), 41–49.
5. Pritchard H.W., Moat J.F., Ferraz J.B.S., et al. Innovative approaches to the preservation of forest trees. *Forest Ecology and Management*, 2014, (333), 88–98. doi: 10.1016/j.foreco.2014.08.012
6. Gaidamashvili M., Khurtsidze E., Khechoshv V. Conservation of six threatened tree species of Georgia by *in vitro* propagation. *Acta Hort.*, 2017, (1187), 189–198. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1187.20
7. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя. *Физиология растений*, 1999, 46(6), 950–953.
8. Машкина О.С., Буторина А.К., Табацкая Т.М. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины. *Генетика*, 2011, 47(8), 1073–1080. doi: 10.1134/S1022795411080126.
9. Korchagin O.M., Mashkina O.S., Tregubov O.V. Field trials of micropropagated clones of triploid white and grey poplars. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 2019, (226), 8pp. doi: 10.1088/1755-1315/226/1/012007
10. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф., Кузнецова Т.Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2013, 312.
11. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. *Физиология растений*, 2016, 63(6), 812–822. doi: 10.7868/S0015330316050134
12. Vidyagina E.O., Filippov M.V., Shestibratov K.A. Long-term of different aspen genotypes *in vitro* without repotting. *Plant cell biology in vitro and biotechnology: Proc. Conf.*, Kazan, October 14–18, 2013, 274.
13. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф. Ботанические заказники карельской березы в Республике Карелия: история, современное состояние и проблемы. *Ботан. журн.*, 2018, 103(2), 256–265. doi: 10.1134/S0006813618020096
14. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф. Роль особо охраняемых природных территорий в сохранении генофонда карельской березы. *Труды КарНЦ РАН, серия Экологические исследования*, 2018, 10, 3–10. doi: 10.17076/eco912.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15(13), 473–497.
16. Способ длительного хранения *in vitro* микрорастений березы. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Внукова Н.И. Патент на изобретение RUS 2634409 03.10.2016. Опубл. 26.10.2017 Бюл. №30.
17. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Внукова Н.И. Унифицированные биотехнологические параметры долгосрочного хранения коллекции березы *in vitro* в различных режимах. *Современная лесная наука: проблемы и перспективы*. Воронеж: Истоки. 2017, 33–38.
18. Lebedev V.G., Azarova A.B., Arkaev M.S. et al. Effective mass propagation of various *Betula* species via *in vitro* culturing. *Biotechnologiya*, 2017, 33(2), 76–88. doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-76-88
19. Wynne J., McDonald M.S. Adventitious root formation in woody plant tissue: the influence of light and indole-3-butyric acid (IBA) on adventitious root induction in *Betula pendula*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2002, 38(2), 210–212. doi: 10.1079/IVP2001266
20. Smykal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 2007, 26(11), 1985–1998. doi:10.1007/s00299-007-0413-9
21. Гигалошвили 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, 413.
22. Kutas E., Ogorodnyk L. Acclimatization results of micro-propagated plantlets. *African J. Plant Sci.*, 2015, 9(3), 124–127. doi: 10.5897/AJPS2015.1274
23. Ryynanen L., Aronen T. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant Cell., Tissue and Organ Culture*, 2005, (83), 21–32. doi: 10.1007/s11240-005-3396-7
24. Iliev I., Kitin P., Funada R. Morphological and anatomical study on *in vitro* root formation of silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Propagation Ornamental Plants*, 2001, 1(1), 10–19.
25. Durkovic J., Mišalová A. Wood formation during *ex vitro* acclimatization in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 2009, 96(3), 343–348. doi: 10.1007/s11240-008-9492-8
26. Жигунов А.В., Шабунин Д.А., Бутенко О.Ю. Лесные плантации триплоидной осины, созданные посадочным материалом *in vitro*. *Вестник ПГТУ. Серия: Лес. Экология. Природопользование*, 2014, 4(24), 21–30.
27. Tisarum R., Samphumphung T., Theerawitaya C., et al. *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2018, 133(2), 215–223. doi: 10.1007/s11240-017-1374-5
28. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Опытные плантационные культуры лиственных древесных растений, созданные на основе клонального микроразмножения. *Размножение лесных растений в культуре in vitro как основа плантационного лесовыращивания*. Йошкар-Ола: Поволжский гос. технол. ун-т. 2014, 87–93.
29. Саматова И.С., Шарова Е.И., Щипарев С.М. и др. Динамика физиологических и биохимических показателей микрорастений ежевики при длительном хранении *in vitro*. *Вестник Санкт-Петербургского университета*, 2008, 3(3), 127–137.
30. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Глотова И.В. и др. Темновое развитие проростков гречихи и накопление в них фенольных соединений в присутствии ионов кадмия. *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*. Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2016. С. 52–56.

Long-term *in vitro* Storage Technique of Valuable Birch Genotypes and Plant Production on its Basis

O.S. MASHKINA^{1,2,*}, T.M. TABATSKAYA¹, N.I. VNUKOVA¹

¹Russian National Research Institute of Forest Genetics, Selection and Biotechnology, Voronezh, 394087 Russia

²Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

*e-mail: mashkinaos@mail.ru

Received March 27, 2019

Revised April 26, 2019

Accepted May 11, 2019

Abstract—A technique for the long-term (up to 27 years) *in vitro* storage of valuable birch genotypes under normal (25 °C, 2.0 klx, 16-h day and 8-h night) and low temperature (4 °C, 0.5 klx, 6-h day and 18-h night) growing conditions on hormone-free media has been described. The study explored for the first time the influence of different strategies to store the clones of *Betula pubescens* and *B. pendula* var. *carelica* (6 genotypes) on the regenerative capacity of collection samples, adaptive potential of regenerated plants and plant production by the *in vitro* and *ex vitro* techniques. It was established that both storage strategies provided a persistently high survival rate (82–100%) and regenerative capacity of *in vitro* shoots (the multiplication coefficient of 4.2–6.3 and rhizogenic activity of 90–100%). The clones retained their characteristics of height growth under the *in vitro* and *ex vitro* conditions, and demonstrated intraclonal homogeneity and lack of signs of somaclonal variability. The plants showed substantial interspecific differences at the stage of multiplication and transfer to the greenhouse. The highest percentage of acclimated plants (75–98% depending on the clone genotype) was obtained after planting of micro plants straight in the greenhouse, which simplified the technology and made plant production less costly.

Key words: long-term *in vitro* storage, birch, species, genotype, micropropagation, *ex vitro* adaptation, plant material

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-57-67