

УДК 630\*165.6: 631.147(075.8)

## БИОТЕХНОЛОГИИ И ТРАДИЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОЗДАНИЯ КУЛЬТУР ТОПОЛЯ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ ЦЧР

А.И. Сиволапов<sup>1</sup>, В.А. Сиволапов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Россия

<sup>2</sup> Филиал ФБУ «Рослесозащита» «ЦЗЛ Воронежской области», Россия

В зоне защитного лесоразведения плантационное лесоводство является одним из путей интенсификации древесины [5]. Наиболее перспективным для плантационного выращивания является тополь (*Populus sp.*), который за быстроту роста и скороспелость в ЦЧР называют «эвкалиптом Севера». Древесина тополя уступает сосне и, конечно, дубу, однако, находит применение для термомеханического модифицирования, для целлюлозно-бумажного производства, вискозной промышленности, спичечного и фанерного производства. Тополь используется для укрепления оврагов, лесомелиорации пойм, полезащитного лесоразведения, озеленения городов (мужские экземпляры) и т. д. Тополь наиболее продвинут в селекционном отношении. Для него получены не только гибриды, но и сорта [2, 3, 5]. Особый практический интерес представляют триплоидные тополя ( $2n=3x=57$ ), нередко проявляющие соматический гетерозис и устойчивость к различным биотическим и абиотическим факторам [4, 9]. Высокая скорость роста и легкость вегетативного размножения большинства видов и гибридов, более раннее (по сравнению с основными лесообразователями) наступление эксплуатационной зрелости и более короткий период ротации создают преимущества для плантационного (ускоренного) выращивания ценных форм и сортов на древесину, фитомассу (для получения кормовых добавок сельскохозяйственным животным) и целей биоэнергетики [5].

Некоторые представители подрода Лейка – *Leuce Dode* и настоящие тополя (*Europulus Dode*) из секции черных тополей (осокорь), белых тополей (тополь белый и сереющий) и осина относятся к трудно черенкуемым традиционным способом. Тополь белый (*P. alba* L.) и т. сереющий (*P. canescens* Sm.), являющийся спонтанным гибридом между тополем белым и осиной, по продуктивности древостоев, качеству древесины и др. значительно превосходят тополя других видов, произрастающих в лесах Воронежской области, в том числе черный, или осокорь – *P. nigra* L. По этой причине многие ценные формы, гибриды и полиплоиды тополя белого и сереющего (высокопродуктивные, декоративные, засухо- и морозоустойчивые и др.) не находят широкого применения в практике лесного хозяйства [4, 7–9].

Из традиционных методов размножения трудноукореняемых тополей наиболее успешным является зеленое черенкование. На успешность зеленого черенкования гибрида тополь белый × осина (искусственно полученного тополя сереющего) большое – решающее влияние оказывают условия среды, в которых укореняются черенки. Оптимальные условия среды (температура, влажность, освещенность) очень резко, в несколько раз увеличивают процент укореняемости черенков и одновременно увеличивают рост саженцев. Так, укоренение черенков искусственного гибрида тополь белый × осина без их обработки (контроль) было в теплице (оптимальные условия) – 82 %, повышая в лучших условиях среды и процент укоренения обработанных стимуляторами черенков. В этом же опыте черенки, обработанные этилкротиловым эфиром, в полиэтиленовом укрытии укоренились на 61 %, в теплице – на 86 %. Средняя высота укорененных саженцев в теплице достигала 40 см. [3].

Ряд исследователей, производивших опыты по зеленому черенкованию белых тополей, отмечают большую важность для успеха дела заготовку зеленых черенков на определенном этапе развития побега, в самом начале его одревеснения у основания прироста. Этот этап нам удалось определить для условий района Воронежа на основе фенологических наблюдений, увязать со сроками и фазами цветения акации белой, что имеет существенное значение для своевременной заготовки зеленых черенков.

На основе опытов для практических целей успешного зеленого черенкования гибридов т. белый × осина можно рекомендовать:

1) Заготовку черенков с маточных плантаций в оптимальные сроки с придержкой для них по срокам цветения белой акации.

2) Производить черенкование в оптимальных условиях среды, указанных для теплицы без применения стимуляторов, поскольку оно в этих условиях не эффективно.

3) При черенковании в менее благоприятных условиях – полиэтиленовые укрытия, теплицы с пониженными условиями, по сравнению с оптимальными для гибрида т. белый × осина (температура, влажность, освещенность) – применять обработку зеленых черенков стимуляторами: этилкротиловым эфиром этиленгликоля и гетероауксиновой пудрой.

Размножение сортов тополя Хоперский 1 и Приярский зелеными черенками.

Тополь сереющий относится к слабоукореняющимся породам. Первые опыты по их размножению предварительно обработанными зимними черенками (от взрослых деревьев 20–40 лет) в открытом грунте не дали положительных результатов. Тогда для «омоложения» побегов от отобранных деревьев (Хоперского триплоидного тополя, дерево 1, пол женский, в возрасте 41 года и Донского – пол мужской, в возрасте 23 лет) были сделаны прививки черенками в боковой зарез коры. Подвоем служили черенковые саженцы тополя белого и гибрида тополь белый × осина, высаженные в клоновом архиве мутантов тополя в Семилукском лесопитомнике. Женский клон полиплоидной формы тополя сереющего (родоначальник сорта тополя Хоперский 1) уже в первый год дал высокую приживаемость прививок, в то время как мужской клон (по фенотипу близок к осине, в последствии сорт тополя Приярский) только на третий год дал две удачные прививки из девятнадцати. Низкая приживаемость прививок объясняется, по-видимому, несовместимостью древесины подвоя и привоя: у тополя Приярского плотность древесины как у дуба, а у подвоев более низкая плотность древесины.

Размножение сортов зелеными черенками. При этом способе в качестве черенков используют облиственные части однолетних побегов, которые отрезают от ветвей маточных растений без существенного для них ущерба. Наличие на черенках листьев, активная дифференциация меристематических тканей и их высокая жизнедеятельность способствуют регенерационным процессам и восстановлению целостности организма. Применение же синтетических регуляторов роста для обработки черенков позволяет ускорить корнеобразовательный процесс, улучшить развитие корневой и надземной систем и увеличить выход укорененных черенков.

Для тополя Хоперский 1 лучшим сроком заготовки побегов считается 3 – 5-дневный срок после начала цветения акации белой. К этому времени побеги становятся упругими, корка в нижней части начинает буреть (одревесневать). Определенных календарных сроков для их заготовки побегов назвать нельзя, так как они зависят от погодно-климатических условий района черенкования. Пример конкретного выполнения:

Однолетние (мощные) побеги с прививок тополя Хоперский 1 в возрасте 3 – 4 лет были использованы для заготовки черенков. Черенки обрабатываются водным раствором лактонов РВУ-1 и РВУ-9 в концентрации 0,01 % при экспозиции 18 час. В качестве контроля берутся черенки, обработанные в воде. Подготовленные черенки высаживаются в теплицу с полиэтиленовым покрытием на песчано-торфяной субстрат (соотношение песка и торфа 1:1). Опыты закладываются в 3 – 6-кратной повторностях с количеством черенков от 30 до 60 (рисунок 1).



Рисунок 1 – Размножение тополя Хоперский 1 зелеными черенками

В теплице с туманообразующей установкой поддерживали относительную влажность воздуха около 80 %. По данным осенней инвентаризации, определено, что в контрольном варианте укоренилось 73,4 % черенков, при обработке черенков лактоном РВУ-9–80 %, РВУ-1–93,6 %. При замерах высот у укорененных черенков выявлено, что в опытных вариантах высота черенковых саженцев превзошла контрольные. Если в контрольном варианте она составила всего 9,3 см, то в опытах при обработке РВУ-1 – 11,9 см, а РВУ-9 – 16,4 см, то есть превышение достигло 29–80 % (рис. 2, 3).

Тополь сереющий Приярский не черенкуется, для него применяют только биотехнологии *in vitro*. Применение современных технологий *in vitro* позволит в полной мере

использовать селекционные достижения и проводить интенсивное выращивание качественного посадочного материала ценных генотипов тополя (трудно размножаемых обычными способами) для плантационного лесовыращивания [1, 3, 6].

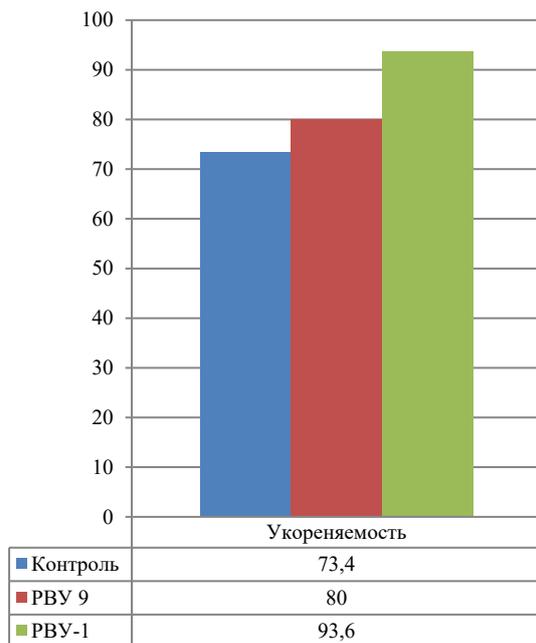


Рисунок 2 – Укореняемость зеленых черенков

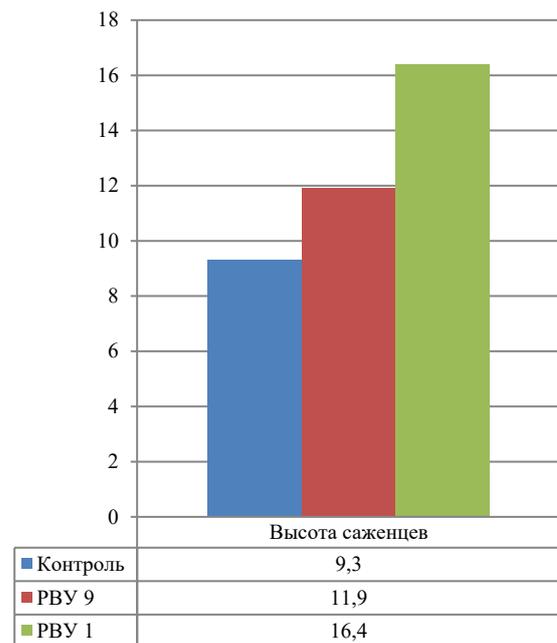


Рисунок 3 – Высота 1-летних черенковых саженцев тополя сереющего Хоперский – 1 тополя сереющего Хоперский – 1

Далее приводятся основные этапы выращивания посадочного материала, а также особенности, при выполнении которых существенно повышается эффективность работы и дает одинаково хороший результат для трудно размножаемого сорта тополя сереющего [2].

Микроклональное размножение можно разделить на несколько этапов:

1 этап – Заготовка побегов, изоляция эксплантов и получение асептических жизнеспособных культур. Получение асептических культур взрослых древесных растений, которые в то же время имеют высокую жизнеспособность и морфогенетическую активность – один из сложных и непредсказуемых моментов культивирования *in vitro*. Это связано с большой бактериальной и грибковой зараженностью исходного материала, а также уменьшением и иногда полной потерей с возрастом тканями регенерационной активности. Лучшим сроком заготовки побегов тополя с маточного взрослого дерева и изоляции эксплантов для культивирования в условиях *in vitro* является июнь месяц. Отбираются побеги с хорошо выраженными пазушными почками и междоузлиями. Срезанные побеги помещают в банках с водопроводной водой в условия холодильника (температура 10–12° С), где выдерживают в течение 3 – 5 суток для их холодной предобработки перед изоляцией эксплантов.

Стерилизация побегов: предварительно отрезки побегов величиной 10 см тщательно промывают теплой водой с хозяйственным мылом, а затем подвергают поэтапной стерилизации:

1) Поверхностная стерилизация коммерческим 2 % раствором “Domestos” (подогретым до 30–40° С) в течение 15 минут с дальнейшей промывкой в проточной водопроводной воде (не менее 20 минут). Реализуется в нестерильных условиях.

2) Основная стерилизация побегов в асептических условиях (в условиях ламинар-бокса) 0.025 % раствором мертиолята в сочетании с жидким дезинфицирующим 7 % р-ром “Белизна” в течение 15 мин, с дальнейшей 5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Для оптимального смачивания побегов во время важнейшей стерилизации в раствор мертиолята рекомендуется добавить Твин 20 (0,08–0,12 %).

Такой способ стерилизации обеспечивает получение до 90 % асептических жизнеспособных культур.

2 этап – Индукция развития основного пазушного побега на первичных эксплантах.

Простерилизованные побеги разрезают в асептических условиях на небольшие части величиной 1,5–2 см с одной пазушной почкой. Экспланты в ламинар-боксе размещают в вертикальном или слегка наклонном положении по одному в культуральные сосуды (стеклянные биологические пробирки) с питательной средой WPM (среда № 1) с добавлением 6-БАП (6 – бензиламинопурина) 0,5 мг/л, ГК (гибберелловой кислоты) 0,2 мг/л. Условия климатического режима: 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2–3 кл, температуре 24–26° С. Через 2–4 недели культивирования из пазушной почки формируется основной побег.

Добавление в питательную среду ГК дает возможность не только повысить количество морфогенных культур в 1,9 раз – у тополя Приярского, но и способствует доращиванию побегов. В этом случае в течение следующего времени с момента начала культивирования развиваются побеги, выделяющиеся хорошим ростом в высоту (4 – 8 см) с необычно развитыми листовыми пластинками, отсутствием признаков соматоклональной изменчивости. Низкое содержание БАП в среде (0.2 мг/л) на начальном этапе культивирования недостаточно для результативной индукции и развития первичных побегов. Более же большое содержание БАП в среде (1.0 мг/л) угнетает развитие эксплантов и рост побегов в высоту.



Рисунок 4 – культуры тополя сереющего из регенерантов *in vitro*. Возраст 23 года.

Результативность укоренения микропобегов в этом случае была высокой и составила до 94 %. На фоне значительной укореняемости микропобегов наблюдался их неплохой рост в высоту. К концу первого месяца культивирования побеги достигали 5–7 см, а через два месяца – 7–12 см.

Для повышения количества индуцированных побегов представляется рекультивирование первичных эксплантов с отрезанным пазушным побегом (снятие апикального доминирования) на среде WPM с уменьшенным содержанием БАП – 0.2 мг/л и выключении ГК 0.2 мг/л или НУК 0.05 мг/л. В этом случае в течение месяца культивирования совершается усиленное множественное формирование дополнительных побегов, выделяющихся хорошим ростом (3–5 см) и нормальным развитием. Количество побегов на 1 эксплант составляет от 6 до 14 побегов.

3 этап – Укоренение изолированных побегов и их мультипликация (собственно клональное микроразмножение) в условиях *in vitro*.

Образовавшиеся пазушные или индуцированные дополнительные побеги (достигшие высоты 1,5 – 3 см) отделяют и переносят на среду для самопроизвольного укоренения – WPM или ½ WPM (с пониженным содержанием макросолей) без гормонов. Более значительные побеги перед посадкой разрезают на микрочеренки с одной пазушной почкой размером 1,5–3 см.

Таким образом, указанные питательные среды стали наилучшими не только для самопроизвольного укоренения микрочеренков, но и для их доращивания.

Для микроклонального размножения рекомендуется использовать все микрочеренки растения-регенеранта, что позволяет поднять продуктивность работы. Это связано с отсутствием основных различий между черенками разного яруса одного растения (верхняя, средняя, нижняя часть побега) по действенности их укоренения в условиях *in vitro*. Все одноузловые сегменты отлично укореняются и имеют нормальный рост.

4 этап – Адаптация в почвенном субстрате в условиях лаборатории и прямая высадка растений из пробирочной культуры в почву, минуя промежуточный этап доращивания в лаборатории.

Прямая высадка растений из пробирочной культуры в почву предусматривает отсутствие промежуточного этапа доращивания в лаборатории.

Растения, извлеченные из пробирок, пикируют в прямолинейные бороздки, сделанные в хорошо разрыхленном и выровненном грунте. Проливают слабым раствором марганцовки (KMnO<sub>4</sub>), присыпают почвой, уплотняют. После успешного укоренения растений и начала их роста в высоту для снижения влажности исключают дополнительный прикорневой полив. Размещение растений – от 100 до 200 штук на 1 м<sup>2</sup> прямолинейными рядами. Между рядами не менее 10 см. Такое размещение способствует качественному и своевременному уходу (рыхление, прополка) в течение первого вегетационного периода, что, в свою очередь, повышает приживаемость пробирочных растений в почве.

Прямая высадка микрорастений тополя сереющего Приярского дала более значительный результат приживаемости до 85,2 %, чем поэтапная адаптация в теплице. Из регенерантов тополя созданы культуры (рисунок 4).

Таким образом, для размножения тополей чаще всего применяют черенкование, а для трудно укореняемых – биотехнологию *in vitro* и создают культуры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Исаков, И.Ю. Биотехнология в лесном хозяйстве [Текст] учебное пособие/ И.Ю. Исаков, А.И. Сиволапов, М.Ю. Нечаева. – Воронеж: ВГЛТУ, 2017. – 208 с.
2. Машкина, О.С. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии *in vitro*/ О.С. Машкина, А.И. Сиволапов, Т.М. Табацкая; ВГЛТА – Воронеж, 2011. – 30 с.
3. Сиволапов, А.И. Тополь сереющий: генетика, селекция, размножение: монография/ А.И. Сиволапов; ВГЛТА, ВГУ, 2005. – 157 с.
4. Сиволапов, А.И. Цитологические, молекулярные и лесоводственно-селекционные исследования коллекции полиплоидных тополей/ А.И. Сиволапов, Д.В. Политов, О.С. Машкина, М.М. Белоконь, В.А. Сиволапов, Ю.С. Белоконь, Т.М. Табацкая // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 50–58.
5. Сиволапов, В. Плантационное лесовыращивание березы, ольхи и тополя с использованием биотехнологии *in vitro* / В. Сиволапов, А. Сиволапов, Т. Благодарова. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMVERT Academic Publishing, 2014. – 120 с. Электронная книга. <http://dnb.d-nb.de>
6. Сиволапов, А.И. Перспективные направления биотехнологии в подготовке специалистов для лесного комплекса ЦЧР [Текст]/А.И. Сиволапов, А.С. Черных, В.А. Сиволапов // Актуальная биотехнология, 2017. – № 2 (21). – С. 118–122.
7. Сиволапов, А.И. Аллотриплоидные клоны тополя сереющего (*Populus canescens* Sm.), отобранные в пойме Хопра и Дона – крупное достижение кафедры лесных культур в селекционном лесоводстве/ А.И. Сиволапов // Успехи современного естествознания. – 2020. – № 2. – С. 25–30.
8. Царев, А.П. Сортоведение тополя [Текст] / А.П. Царев. – Воронеж: ВГУ, 1985. – 152 с.
9. Sivolapov A, Blagodarova T, and Sivolapov V Forty-five-year monitoring of selection stands of white (*Populus alba* L.), gray (*Populus canescens* Sm.), black poplar (*Populus nigra* L.) and willow (*Salix alba* L.) in Khorer State Natural Reserve. FORESTRY 2018. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 226 (2019) 011001. pp. 1–9.