

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛОНОВЫХ ЛЕСОСЕМЕННЫХ ПЛАНТАЦИЙ НА ПРИМЕРЕ ОЛЬХИ

Сиволапов В. А., Чернодубов А.И.

ФГБОУ ВПО «Воронежская государственная лесотехническая академия», Воронеж, Россия (694087, Воронеж, ул. Тимирязева, 8), e-mail: Vladimir-Sivolapov@yandex.ru

Проведен анализ использования микроклонального размножения в создании клонových лесосеменных плантаций (ЛСП) древесных растений на примере ольхи черной и серой. Изучен пыльцевой режим и плодоношение регенерантов *in vitro* и сеянцев на лесосеменной плантации ольхи в возрасте 10 лет. Средняя высота регенерантов составила  $4,9 \pm 0,37$  –  $5,6 \pm 0,69$  м, средний диаметр  $4,7 \pm 0,76$  –  $5,3 \pm 0,73$  см. Средняя высота сеянцев  $4,9 \pm 0,35$  м, средний диаметр  $5,2 \pm 0,68$  –  $5,4 \pm 0,81$  см. Цветение клонов начинается на 3–4 год. Цветение сеянцев наступает с 3–6 лет. Жизнеспособность свежесобранной пыльцы ольхи черной и серой составляет 95 – 98 %. Длина шишек у сеянцев составила в среднем от  $1,6 \pm 0,03$  до  $1,8 \pm 0,06$  см, у регенерантов – от  $1,4 \pm 0,04$  до  $1,7 \pm 0,04$  см. Лабораторная всхожесть семян, полученных от регенерантов и сеянцев, не отличается и составляет 85 %. Показана возможность использования биотехнологии *in vitro* при создании ЛСП, в случае трудности прививок.

Ключевые слова: клонových лесосеменные плантации, ольха черная, ольха серая, биотехнология *in vitro*.

## PERSPECTIVES OF *IN VITRO* BIOTECHNOLOGY USE TO ESTABLISH THE CLONAL FOREST SEED PLANTATIONS BY THE EXAMPLE OF ALDER

Sivolapov V. A., Chernodubov A.I.

Voronezh state academy of forestry engineering, Voronezh, Russia (694087, Voronezh, ul. Timiraysev, 8), e-mail: Vladimir-Sivolapov@yandex.ru

The analysis of application of the microclonal reproduction to establish the clonal forest seed plantations (by the example of black and grey alders) was conducted. The pollen mode and the fruiting of *in vitro* regenerants and seedlings of 10-year-old alder seed plantation were studied. Average height regenerants has made  $4,9 \pm 0,37$  –  $5,6 \pm 0,69$  m., average diameter  $4,7 \pm 0,76$  –  $5,3 \pm 0,73$  cm. Average height seedlings  $4,9 \pm 0,35$  m, average diameter  $5,2 \pm 0,68$  –  $5,4 \pm 0,81$  cm. The flowering of clones begins for 3–4 years. The flowering seedlings comes since 3–6 years. The viability frischgeerntet of pollen of an alder black and sulfur makes 95 – 98 %. Length cones at seedlings has made on the average from  $1,6 \pm 0,03$  up to  $1,8 \pm 0,06$  cm, at regenerants - from  $1,4 \pm 0,04$  up to  $1,7 \pm 0,04$  cm. Laboratory germination of seeds, received from regenerants and seedlings does not differ and makes 85 %. In case of difficulty in grafting, the potential of *in vitro* biotechnology use in forming the forest seed plantations is shown.

Key words: clonal forest seed plantations, black alder, speckled (grey) alder, *in vitro* biotechnology.

### Введение

Современные вопросы лесовозобновления и лесоразведения должны выполняться на генетико-селекционной основе [9, 4, 6 и др.]. Селекционными методами можно значительно повысить продуктивность и качество насаждений, повысить устойчивость лесных культур.

Практически во всех странах мира, отмечает Ю. П. Ефимов [4], основной формой организации семеноводства признаны лесосеменные плантации (ЛСП), создаваемые путем размножения отобранных в насаждениях плюсовых деревьев.

Согласно «Указаниям по лесному семеноводству в РФ» [7] постоянную лесосеменную базу составляют ЛСП, созданные из клонов или семей плюсовых и элитных деревьев, постоянные лесосеменные участки (ПЛСУ), плюсовые деревья, архивы клонов,

географические и испытательные культуры. Лесосеменные плантации – специально создаваемые насаждения, предназначенные для массового получения в течение длительного времени ценных по наследственным свойствам семян лесных растений. При выборе способа закладки многие лесоводы-селекционеры отдавали предпочтение ЛСП вегетативного происхождения, т.к. у потомства в полной мере сохраняются наследственные свойства плюсовых деревьев [8]. При создании прививочных плантаций применяют разные способы прививки [4 и др.]. Однако для таких древесных пород, как ольха, приживаемость и сохранность прививок низкая [1 и др.]. Поэтому метод микроклонального размножения *in vitro* имеет большую перспективу.

### **Материал и методика**

Материалом исследований были регенеранты *in vitro* и сеянцы ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) и ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench.). У регенерантов и сеянцев проведены дендрометрические исследования их высоты, диаметра, ширины кроны, размеров шишек. Жизнеспособность пыльцы определяли методом окрашивания йод-хлоралгидратом [8]. Реактив готовится за 2 – 3 суток: 5 г хлоралгидрата смешивают с 2 мл дистиллированной воды, добавляют кристаллический йод – 0,2 г, настаивают. Этот метод основан на йодной реакции: обычно жизнеспособные пыльцевые зерна полностью заполнены крахмалом. Размеры пыльцы выполнены окуляр-микрометром на микроскопе МБИ-6, микрофотографии – на микроскопе Биолам Р – 15.

### **Результаты исследования и обсуждение**

В Новоусманском лесхозе Воронежской области заложен опытный участок из регенерантов *in vitro* ольхи черной и серой. Опыт представляет интерес по изучению возможности использования последних как посадочный материал для лесосеменных плантаций и лесных культур. В опыте представлены регенеранты 2 типов культуры: культура стеблевых узлов с 1 почкой и каллусная культура. В условиях теплицы регенеранты дорастивались до возраста 1 и 2 лет. В условия опыта регенеранты высажены весной 2002 года. При сравнении роста регенерантов в опыте с закрытой и открытой корневой системой достоверно лучший рост отмечен в первом случае ( $t_{ф}=2,75 > t_{ст.}=2,04$ ). Регенеранты, высаженные в возрасте 1 год, догнали по росту в высоту 2-летние. В 3 года отмечался вторичный рост по всем вариантам опыта и ухудшение общего состояния. Культуры из сеянцев превосходили регенеранты на 0,2 – 0,6 м.

В 2010 году проведено обследование плантации ольхи черной и серой, созданной сеянцами и регенерантами *in vitro*.

Анализ роста клонов и сеянцев показал, что различия между регенерантами и сеянцами были не существенными на 5 % уровне значимости. Средняя высота регенерантов

составила  $4,9 \pm 0,37$  –  $5,6 \pm 0,69$  м., средний диаметр  $4,7 \pm 0,76$  –  $5,3 \pm 0,73$  см. Средняя высота сеянцев  $4,9 \pm 0,35$  м, средний диаметр  $5,2 \pm 0,68$  –  $5,4 \pm 0,81$  см. Уровень изменчивости по высоте у регенерантов был средним – 19 %, повышенным – 25 – 27 % и высоким 32 %. Уровень изменчивости по диаметру был очень высоким.

Генеративное развитие деревьев ольхи семенного происхождения и регенерантов *in vitro* различается. Ольха черная начинает цвести и плодоносить в культурах с 3–6 лет, значительной семенной продуктивности она достигает лишь в 15–20 летнем возрасте [1, 2 и др.]. При микроклональном размножении деревьев ольхи черной они начинают цветение уже на 3–4 год. Нами приводятся сравнительные данные генеративного развития клонированных растений и сеянцев ольхи. Основные лесобразующие породы, в том числе ольха относятся к перекрестно опыляемым растениям, хотя некоторые биотипы дают качественные семена и при самоопылении [1, 4]. Известно, что урожай и качество семян у древесных пород определяются условиями опыления, то есть количеством, составом и качеством пыльцы в период цветения. Мужские цветки собраны в соцветия – густоцветковые сережки. Рано весной (когда тает снег), сережки вытягиваются, и пыльца высыпается.

Известно несколько методов определения жизнеспособности пыльцы в лабораторных условиях [4, 8 и др.]: проращивание пыльцы на жидких средах, твердых средах и экспресс-методы (реакция красителей на жизненно важные ферменты и другие вещества пыльцы). Нами использовался быстрый метод окрашивания пыльцы йод-хлоралгидратом, обычно жизнеспособные пыльцевые зерна полностью заполнены крахмалом. Если пыльцевые зерна полностью окрашиваются реактивом в виде фиолетовых зерен, то пыльца считается жизнеспособной. Половину частично окрашенных зерен относят к жизнеспособным, остальные к нежизнеспособным (рисунок 1). Определение жизнеспособности свежесобранной пыльцы проведено сразу после сбора методом окрашивания йод-хлоралгидратом (таблица 1).

Таблица 1. Жизнеспособность пыльцы регенерантов и сеянцев ольхи черной и серой

Название дерева	Количество окрашенных пыльцевых зерен, %	
	3.04.2011 г.	25.05.2011 г.
Ольха черная № 46 (сеянцы)	98	79
Ольха черная № 46 ( <i>in vitro</i> )	97	74
Ольха черная № 3 ( <i>in vitro</i> )	98	81
Ольха серая № 6 (сеянцы)	95	83
Ольха серая № 6 ( <i>in vitro</i> )	96	87

При определении жизнеспособности пыльцы экспресс-методом установлено, что жизнеспособность пыльцы сеянцев ольхи черной и серой не отличается от

микрклонированных растений. Жизнеспособность пыльцы ухудшается через два месяца на 15 – 20 %, то есть пыльцу можно хранить до двух месяцев. Хранение пыльцы проведено в пробирках в сухом прохладном, темном месте (на дне холодильника).

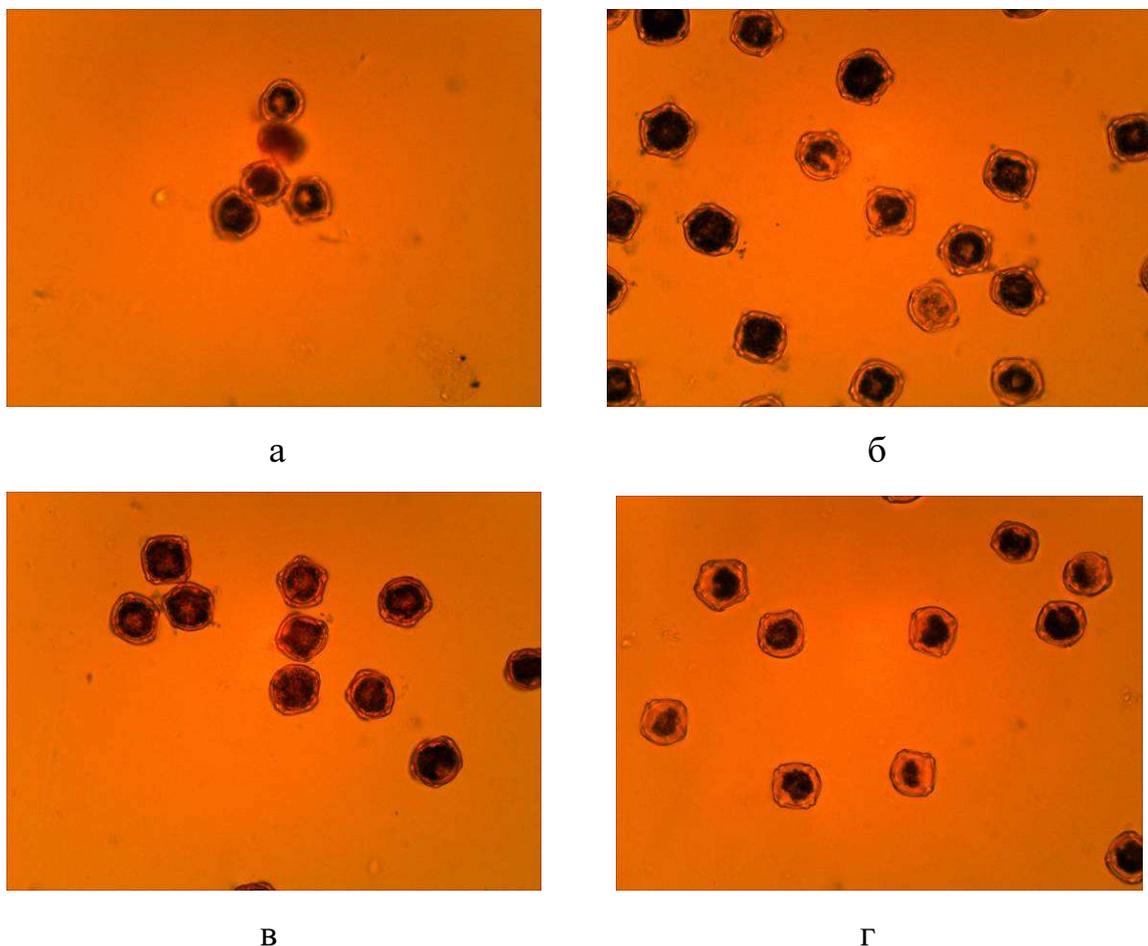


Рисунок 1. Пыльцевые зерна ольхи: а) ольха черная сеянцы; б) ольха черная, регенеранты *in vitro*; в) ольха серая, сеянцы; г) ольха серая, регенеранты *in vitro*

Качественный и количественный состав формирующейся пыльцы в значительной степени определяется динамикой и характером поведения хромосом в мейозе при микроспорогенезе. Известно также, что между размерами пыльцевых зерен и плоидностью существует прямая зависимость. Исходя из этого, по такому морфометрическому показателю, как диаметр пыльцы, можно опосредованно судить об особенностях развития мужского гаметофита исследуемых организмов, об их генетической природе, в частности, о возможной гибридной, мутагенной или полиплоидной природе. Этот показатель важен для перекрестного опыления на лесосеменных плантациях.

Морфометрические показатели качественного состава пыльцы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Диаметр пыльцевых зерен у исследуемых деревьев ольхи черной и серой

№ дерева	Диаметр пыльцы (мкм), количество пыльцевых зерен, %			
	21,7-24,8	27,9-31,0	< 31,0	деформированная пыльца
Ольха черная № 46, сеянец	56	41	-	3
Ольха черная, регенерант от № 46	16	60	22	2
Ольха черная, регенерант от № 3	15	61	23	1
Ольха серая № 6, сеянец	48	52	-	-
Ольха серая, регенерант от № 6	8	36	52	4

Анализ завершающего этапа формирования микроспор показал, что у регенерантов и сеянцев ольхи черной и серой процесс развития мужской генеративной сферы протекает без значительных отклонений и заканчивается образованием качественной, выравненной пыльцы. У регенеранта ольхи черной № 46 и черной № 3 наряду с нормальными выявлены и аномальные пыльцевые зерна, вероятно, гиперанеуплоиды с повышенным числом хромосом микроспоры. Обнаруженные мелкие пыльцевые зерна являются, вероятно, гипоанеуплоидными. Полученные данные на пяти деревьях свидетельствуют о том, что пыльца регенерантов ольхи черной достоверно (на 5 % уровне значимости) крупнее, чем у сеянцев, и соответственно равны  $28,3 \pm 0,41$  и  $25,5 \pm 0,48$ . Различия размеров пыльцы регенерантов *in vitro* и сеянцев существенны на 5 % уровне ( $t_{\text{факт.}} = 5,57 > t_{0,05} = 2,06$ ).

Характеристика количественных показателей у шишек показала, что по коэффициенту формы шишек различия у них были не существенными (рисунок 2).



## Рисунок 2. Обильное плодоношение регенерантов ольхи черной

Коэффициент формы шишек (отношение ширины к длине шишек) составил в среднем 0,50 – 0,64. Длина шишек у сеянцев составила в среднем от  $1,6\pm 0,03$  до  $1,8\pm 0,06$  см, у регенерантов – от  $1,4\pm 0,04$  до  $1,7\pm 0,04$  см. Различия по длине шишек достоверны на 95 % уровне значимости. Ширина шишек у сеянцев составила  $0,9\pm 0,03$ , у регенерантов от  $0,8\pm 0,04$  до  $0,9\pm 0,02$  см. Различия по ширине шишек у сеянцев и регенерантов отсутствуют. Лабораторная всхожесть семян, полученных от регенерантов и сеянцев, не отличается и составляет 85 %.

### Заключение

Таким образом, первые опыты использования регенерантов *in vitro* ольхи для создания клоновых лесосеменных плантаций и культур этой породы представляют огромный интерес в селекционно-семеноводческой и лесокультурной практике. Изучение качественных и количественных характеристик пыльцы, шишечек и семян деревьев-регенерантов показало перспективность микрклонального метода при создании клоновых лесосеменных плантаций.

### Список литературы

1. Благодарова Т. А. Селекция ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L) Gaertn.) для разведения в Центрально-Черноземном районе: автореф. дис... канд. с.-х. наук. – Воронеж, 1995. – 19 с.
2. Давыдов М. В. Особенности роста черноольховых насаждений / М. В. Давыдов // Лесное хозяйство. – 1976. – № 8. – С. 43 – 45.
3. Ефимов Ю. П. Генетико-селекционные основы лесного семеноводства [Электронный ресурс] / Ю. П. Ефимов // X юбилейный международный лесной форум: Международная научно-практическая конференция «Роль леса в стабилизации климата: Исследования-Инновации-Инвестиции-Кадровый потенциал», 3 – 7 окт. 2008 г. – СПб.: В. К. Ленэкспо. – 16 с.
4. Ефимов Ю. П. Семенные плантации в селекции и семеноводстве сосны обыкновенной / Ю. П. Ефимов. – Воронеж: Изд-во «Истоки», 2010. – 253 с.
5. Исаков И. Ю. Влияние способа опыления на селекционные особенности семенного потомства *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* Ehrh: автореферат канд... с.-х. наук. – Воронеж, 2001. – 19 с.
6. Лесной кодекс Российской Федерации. Комментарии: изд. 2-е, доп. / под общ. ред. Н. В. Комаровой, В. П. Рощупкина. – М.: ВНИИЛМ, 2007. – 856 с.

7. Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации. – М.: Рослесхоз. 2000. – 198 с.
8. Сиволапов А. И. Селекция и семеноводство древесных растений: уч. пособие / А. И. Сиволапов. – Воронеж: ВГЛТА, 2011. – 204 с.
9. Danell O. Survey of past, current and future Swedish forest tree breeding/ Danell O. [Pap] Joint. Meet. IUFRO Work. Part. S.2. 04-02 and S.2.02-16, Tuusula, Sept. 1991 // *Silva fenn.* – 1991. – 25. – № 4. – P. 241-247.

**Рецензенты:**

Панков Я. В., д.с.-х.н., профессор кафедры лесных культур, селекции и лесомелиорации ФГБОУ ВПО "Воронежская государственная лесотехническая академия", г. Воронеж.

Ефимов Ю. П., д.с.-х.н., профессор, главный научный сотрудник ФГУПНШ лесной генетики и селекции, г. Воронеж.