

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ *IN VITRO* КЛОНОВ ТОПОЛЯ И ОСИНЫ

Е. А. Шабанова<sup>1</sup>, Н. И. Внукова<sup>1</sup>, О. С. Машкина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»  
Поступила в редакцию 25.12.2019 г.

**Аннотация.** Поддержание коллекций *in vitro* – эффективный способ сохранения лесных генетических ресурсов. В ФГБУ «ВНИИЛГИСБиотех» создана коллекция ценных генотипов лиственных древесных растений. Разрабатываются методы увеличения периода беспересадочного хранения клонов, подбираются условия, способствующие замедлению роста и развития, а также сохранению регенерационного потенциала и успешному возобновлению микрорастений. Целью данной работы является апробация питательных сред с различными добавками (осмотики, ретарданты, адсорбенты, регуляторы роста, аминокислоты) для хранения микрорастений новых клонов тополя и осины в условиях пониженной положительной температуры, слабой освещенности, короткого фотопериода.

Приведены результаты хранения *in vitro* 11 клонов различных видов и гибридов тополя и осины (*P. alba* L., *P. alba* L. × *P. tremula* L., *P. alba* L. × *P. bolleana* Lauche, *P. tremula* L.) при температуре +4±2°C, освещенности 0.5 клк, фотопериоде 6 ч день/18 ч ночь в течение 12 месяцев. Базовой питательной средой служила модифицированная среда Woody Plant Medium с половинным набором макросолей (½ WPM). Проанализированы сохранность, возобновление роста и укореняемость микрочеренков. Подобрано 6 вариантов питательных сред, позволяющих хранить культуры с высокой сохранностью (75-100%). Укореняемость микрочеренков на опытных средах варьировала от 85.0 (салициловая кислота 1 мг/л) до 98.2% (активированный уголь 15 г/л). Наибольшее число корней образовалось на среде с хлорхолинхлоридом (в среднем 4 шт.). На средах с абсцизовой кислотой и аргинином наблюдались низкая укореняемость и сильное торможение роста микропобегов. Восстановление роста этих культур происходило в 2-3 раза медленнее по сравнению с контролем.

Лучшие результаты были получены при хранении культур на питательной среде ½ WPM с добавлением активированного угля 15 г/л или поливинилпирролидона 150 мг/л при температуре +4±2°C, слабой освещенности (0.5 клк), коротком фотопериоде (6 ч день/18 ч ночь) в течение 12 (сохранность 97-100%) или 18 месяцев (83-86%). Данные среды могут быть рекомендованы для долгосрочного хранения *in vitro* ценных клонов осины, тополя белого, гибридов тополя белого и осины, гибридов тополя белого и Болле.

**Ключевые слова:** длительное хранение, *in vitro*, тополь, осина, осмотики, ретарданты, адсорбенты, регуляторы роста, активированный уголь, поливинилпирролидон.

Развитие биотехнологических методов сохранения генетических ресурсов древесных растений имеет стратегическое значение для поддержания биоразнообразия естественных экосистем и защиты селекционных достижений. К преимуществам методов хранения *in vitro* относят экономию площадей и затрат труда, независимость от климатических условий, минимальный необходимый объем исходного материала, возможность сохранения

и репродукции генотипов, трудноразмножаемых традиционными способами [1-4].

Коллекции, хранящиеся при замедленном или минимальном росте (депонированные), являются одним из наиболее распространенных видов генетических банков растений [1]. Методы ограниченного роста, как правило, основаны на модификациях регламентов культивирования, обычно использующихся для микроразмножения. Это позволяет при необходимости легко переключаться на режим быстрого тиражирования [4]. Подбор оптималь-

ных регламентов культивирования определяется потребностями видов в отношении температуры, освещенности, фотопериода и способностью выдерживать стрессовые условия, чтобы обеспечить высокую сохранность микрорастений, их последующую регенерационную способность, а также высокий процент приживаемости *ex vitro* [1, 5, 6].

Для увеличения интервала между субкультивированиями микрорастения хранят при пониженной температуре, низкой интенсивности света или коротком фотопериоде; модифицируют состав питательной среды, сокращая концентрацию макро- и микроэлементов, добавляя осмотики (маннит, сорбит, полиэтиленгликоль), ретарданты, тормозящие рост культур (абсцизовая кислота, хлорхолинхлорид), адсорбенты (активированный уголь, поливинилпирролидон), стресс-протекторы (салициловая кислота), аминокислоты и др. [1, 7-9].

Для листовых древесных растений разработаны регламенты хранения при замедленном росте сроком от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от вида. Однако на древесных растениях такие исследования немногочисленны, рекомендованные способы апробированы на отдельных таксонах [9-11]. Нередко отмечаются сортовые и генотипические различия в эффективности хранения *in vitro* [6, 11-13]. В связи с этим, актуальными являются совершенствование и поиск путей унификации технологии длительного хранения древесных растений в коллекциях *in vitro*.

Во Всероссийском НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии создана и длительно поддерживается (свыше 28 лет) коллекция *in vitro* клонов ценных генотипов листовых древесных растений, насчитывающая в настоящий момент (январь 2020) 70 клонов березы, тополя, осины и ивы [14, 15]. Разработан способ длительного хранения *in vitro* при пониженной температуре в темноте микрорастений березы [14], ведется работа по подбору условий длительного хранения при пониженной температуре клонов тополя [16, 17]. Коллекция пополняется новыми генотипами, в том числе быстрорастущими, продуктивными и устойчивыми формами, гибридами и сортами тополя и осины. В связи с этим, целью данной работы является апробация питательных сред с различными добавками (осмотики, ретарданты, адсорбенты, регуляторы роста, аминокислоты) для беспересадочного хранения микрорастений новых клонов тополя и осины в условиях пониженной положительной температуры.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали 11 размноженных *in vitro* клонов быстрорастущих, продуктивных и устойчивых генотипов тополя и осины селекции А.П. Царева (№143 – *P. alba* L.; Болид, Ведуга, №26-11 – *P. alba* L. × *P. bolleana* Lauche) [18, 19], М.М. Вересина (№01-03 – *P. alba* L. × *P. tremula* L.) [18], А.С. Яблокова (тополь Советский пирамидальный – *P. alba* L. × *P. bolleana* Lauche) [18], В.П. Петрухнова (№02-01, №6/3, №07-02, №11-01 и №15/01 – *P. tremula* L.) [15, 20]. Клоны были получены в 2014-2016 гг. путем прямого органогенеза и поддерживались в стандартных условиях культивирования (25±2°C, освещенность 2 клк, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь) при периодическом субкультивировании (раз в 2-6 месяцев) [21].

Базовой питательной средой служила модифицированная среда Woody Plant Medium с половинным набором макросолей (½ WPM) [22], содержащая 7 г/л агара, 20 г/л сахарозы, 100 мг/л мезо-инозита, 2 мг/л глицина, 10 мг/л глутамина, 1 мг/л тиамина, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты.

Тестировались варианты сред с добавлением активированного угля (АУ) – 15 г/л, салициловой кислоты (СК) – 1, 10, 50 и 100 мг/л, полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) – 5 г/л, поливинилпирролидона 10000 (ПВП) – 150 мг/л, хлорхолинхлорида (ССС) – 100 мг/л, абсцизовой кислоты (АБК) – 1, 5 и 10 мг/л, аргинина 100 и 200 мг/л.

До укоренения и появления первых листьев (2-3 недели) микрочеренки выдерживались в стандартных климатических условиях, а затем хранились в холодильной камере при +4±2°C, слабой освещенности 0.5 клк, коротком фотопериоде 6 ч день/18 ч ночь в течение 1 года. Анализ сохранности микрорастений проводили после 12 месяцев хранения в холодильной камере, а затем возобновления роста через 1 месяц в стандартных климатических условиях. Для части культур оценка проводилась через 18 месяцев (12 мес при пониженной температуре + 6 месяцев в стандартных условиях).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными подходами для оценки эффективности хранения культур *in vitro* в условиях замедленного роста являются учет сохранности культур и способности к возобновлению нормального роста и развития в стандартных климатических условиях.

Укореняемость микрочеренков на опытных средах варьировала от 85.0 (СК 1 мг/л) до 98.2%

(АУ 15 г/л). Наибольшее число корней наблюдалось на среде с хлорхолинхлоридом – 4.0 шт.

В таблице 1 представлены результаты беспересадочного хранения микрорастений тополя и осины в течение 12 месяцев на 6-ти наиболее оптимальных по составу питательных средах. Сохранность культур на этих средах была высокой и составила в зависимости от клона 75-100% (по сравнению с 83-100% в контроле – ½ WPM без добавок). Лучшие результаты по хранению в течение 18 месяцев получены на средах с адсорбентами: активированным углем 15 г/л и поливинилпирролидоном 150 мг/л – 82.7% и 85.7% соответственно.

Полученные результаты подтверждают эффективность ранее подобранных нами для тополя белого и сереющего питательных сред с добавлением активированного угля или поливинилпирролидона для хранения *in vitro* осины, гибридов тополя белого и Болле [16-17].

Возможность длительного хранения микрорастений на данных средах может быть связана с поглощением АУ и ПВП продуктов окисления фенолов, которые при накоплении в питательной среде ингибируют деление клеток, рост, и могут приводить к гибели культур. Адсорбенты используют в случае избытка фенольных соединений в тканях первичных эксплантов при вве-

Таблица 1

Сохранность клонов тополя и осины после депонирования при пониженной положительной температуре на питательной среде ½ WPM с различными модификациями

Питательная среда ½ WPM с различными добавками	Клон	Сохранность после 12 мес. хранения, %	Сохранность после 18 мес. хранения, %
контроль (без добавок)	01-03	100	50.0
	№143	100	80.0
	Болид	85.7	не учтено
	Ведуга	88.9	
	26-11	100	
	Т. Советский	83.3	
	02-01	90.0	66.7
	6/3	83.3	
	07-02	93.8	
11-01	83.3		
15/01	100	50.0	
Среднее		91.7±2.21	61.7±4.38
активированный уголь 15 г/л	Болид	85.7	не учтено
	26-11	100	
	Т. Советский	100	
	02-01	100	
	6/3	100	77.8
	07-02	90.0	не учтено
	11-01	100	87.5
15/01	100		
Среднее		97.0±2.03	82.7±2.42
салициловая кислота 1 мг/л	01-03	100	50.0
	№143	75.0	87.5
	07-02	88.8	75.0
	15/01	100	80.0
Среднее		<b>91.0±5.94</b>	<b>73.1±8.10</b>
полиэтиленгликоль 5 г/л	01-03	100	не учтено
	№143	100	
	07-02	87.5	71.4
	15/01	100	70.0
Среднее		<b>96.9±3.12</b>	<b>70.7±0.49</b>
поливинилпирролидон 150 мг/л	01-03	100	не учтено
	№143	100	
	07-02	100	85.7
	15/01	100	85.7
Среднее		<b>100</b>	<b>85.7</b>
хлорхолинхлорид 100 мг/л	07-02	100	41.7
	15/01	100	69.2
Среднее		<b>100</b>	55.4±13.79

дени в культуру *in vitro* [2, 23, 24]. Они также применяются для увеличения сроков длительного беспересадочного хранения культур [13]. Эффективность АУ в культуре тканей связывают с необратимой адсорбцией ингибирующих рост веществ, а также с адсорбцией и последующим высвобождением витаминов, регуляторов роста, ионов металлов [25-26].

По данным Fathy [27] наиболее эффективным для тополя белого оказалось хранение культур на питательной среде MS при температуре +4°C в темноте. Сохранность культур в течение 12 месяцев составила 52% по сравнению с хранением при 24°C на средах с добавлением активированного угля 3% (33%), маннита 9.1 (8%) и 45.5 г/л (0%), хлорхолинхлорида 2.5 (32%) и 25 мг/л (20%).

На травянистых растениях показано, что добавление в питательную среду поливинилпирролидона приводило к увеличению срока жизни каллусов при редком субкультивировании за счет снижения накопления суммы полифенолов в тканях [28].

На средах с хлорхолинхлоридом и полиэтиленгликолем нам удалось добиться высокой (96.9-100%) сохранности культур после 12 месяцев хранения (таблица 1). Однако наблюдалось более медленное по сравнению с другими опытными вариантами восстановление роста микрорастений (рисунок 1).

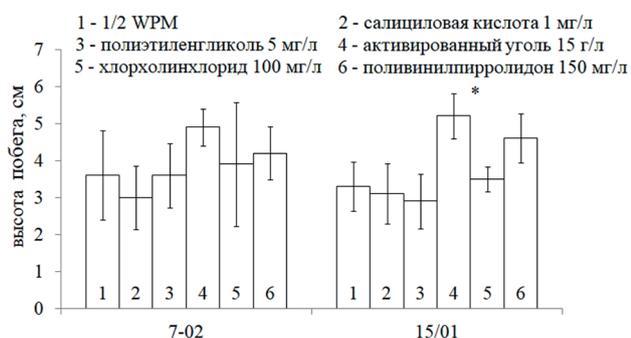


Рис. 1. Восстановление роста культур осины в течение месяца в стандартных условиях культивирования после 12 месяцев хранения при пониженной температуре. Примечание. \*достоверные различия с другими вариантами питательных сред при  $p < 0.05$

Хранение при пониженной положительной температуре на средах с хлорхолинхлоридом успешно применяется для декоративных и плодовых растений [12]. Для некоторых видов травянистых растений показано, что добавление ССС приводило к оводнению побегов и снижению жизнеспособности

эксплантов [13]. На тополе было показано, что растения на средах с ССС имеют высокую сохранность, но медленно восстанавливают рост и с трудом черенкуются [16]. В опытах с полиэтиленгликолем на горохе было замечено, что с увеличением срока культивирования ткани становятся более чувствительными к осмотическому стрессу [29].

Использование салициловой кислоты в концентрации 1 мг/л позволило сохранить 50-87.5% микрорастений в течение 18 месяцев хранения. Повышение концентрации (10-100 мг/л) приводило к угнетению морфогенеза, некрозам [30]. СК является сигнальной молекулой в развитии ответа растений на различные стрессовые факторы, играет роль в развитии системной приобретенной устойчивости, однако данные по содержанию СК в тканях растений немногочисленны и варьируют даже в пределах одного растения [31]. Показано, что концентрация СК выше 1.0 мМ оказывала ингибирующее действие на дыхание митохондрий табака [32].

В наших исследованиях отмечена разница в процессе возобновления роста культур одних и тех же клонов после хранения на разных по составу питательных средах. Так, наиболее быстро культуры осины восстанавливались на среде с добавлением активированного угля 15 г/л (рисунок 1, 2).

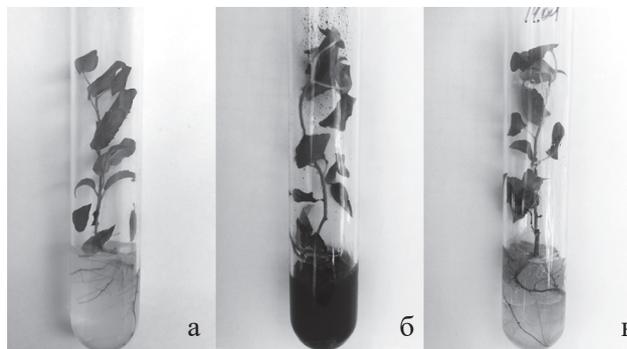


Рис. 2. Общий вид культур осины 15/01 после 12 месяцев депонирования и 2 месяцев восстановления роста в стандартных условиях культивирования на средах: 1/2 WPM (а); 1/2 WPM + активированный уголь 15 г/л (б); 1/2 WPM + поливинилпирролидон 150 мг/л (в).

Восстановившиеся в течение 1-2 месяцев культуры тестировали на жизнеспособность. Микрочеренкование проводили на безгормональной питательной среде 1/2 WPM. Средняя укореняемость микрочеренков варьировала от 87.5% (ПЭГ, ССС) до 95% (ПВП).

В другой серии опытов на клонах осины нами апробированы среды с абсцизовой кислотой (АБК, 1-10 мг/л) и аргинином (100-200 мг/л). Во всех

опытных вариантах наблюдались низкая укореняемость микрочеренков и сильное торможение роста побегов (таблица 2). Это согласуется с данными, полученными на других древесных растениях. Так, микрорастения березы после длительного культивирования на средах, содержащих 5-10 мг/л АБК, во втором пассаже имели более низкие значения по высоте и числу корней по сравнению с контролем [9]. АБК при высоких концентрациях 20 мМ (5,3 мг/л) ингибировала побегообразование у каштана [11].

Аргинин увеличивает активность антиоксидантной системы при холодовом стрессе *in vitro* [33]. По данным исследований на плодовых, аргинин в концентрации 100-200 мг/л оказывал положительное влияние на формирование корней *in vitro* [34-35]. В наших исследованиях на осине на аналогичной питательной среде формировались корни размером не более 0.3-0.5 см, а у части культур морфогенез полностью отсутствовал. Уже через 6 месяцев депонирования сохранность

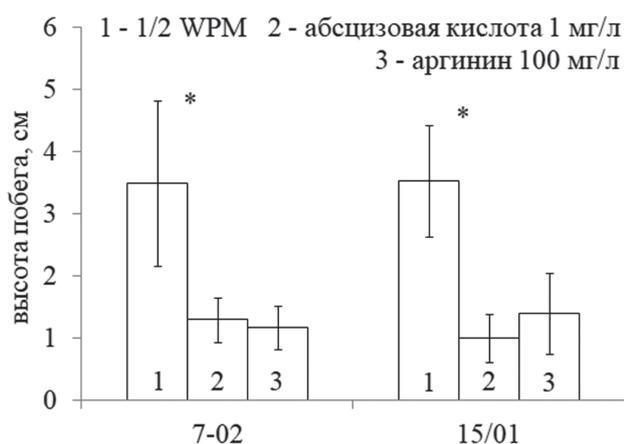


Рис. 3. Высота микропобегов осины после депонирования на средах с абсцизовой кислотой и аргинином через 6 месяцев хранения. Примечание. \*достоверные различия с другими вариантами питательных сред при  $p < 0.001$ .

культур была ниже, чем в контроле (таблица 2). Восстановление роста сохранившихся культур на средах с АБК и аргинином происходило в 2-3 раза медленнее по сравнению с контролем (рисунок 3). Причем, на средах с 5 и 10 мг/л АБК после 6 месяцев хранения рост отсутствовал.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на 11 клонах тополя и осины апробированы 8 вариантов питательных сред на основе  $\frac{1}{2}$  WPM с добавлением активированного угля, салициловой кислоты, полиэтиленгликоля, поливинилпирролидона, хлорхолинхлорида, абсцизовой кислоты, аргинина.

Лучшие результаты были получены при хранении культур на питательной среде  $\frac{1}{2}$  WPM с добавлением активированного угля 15 г/л или поливинилпирролидона 150 мг/л при температуре  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ , слабой освещенности (0.5 клк), коротком фотопериоде (6 ч день/18 ч ночь) в течение 12 (сохранность 97-100%) или 18 месяцев (83-86%). Данные среды могут быть рекомендованы для хранения *in vitro* ценных клонов осины, тополя белого, гибридов тополя белого и осины, гибридов тополя белого и Болле.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Rome, IPGRI Handbook for Genebanks, 2004, No. 7, p. 106.
2. Confalonieri M. Bisoffi S., Balestrazzi A., Carbonera D. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. Vol. 72. pp. 109–138.
3. Šijačić-Nikolić M., Milovanović J., Nonić M. // Biotechnology and Biodiversity. 2014. pp. 103—128.

Таблица 2.

Биометрические показатели клонов осины при депонировании *in vitro* на питательной среде  $\frac{1}{2}$  WPM с абсцизовой кислотой (АБК) и аргинином в течение 6 месяцев

Клон	Добавка, мг/л	Укореняемость, %	Среднее количество корней, шт	Побегообразование, %	Сохранность, %	
07-02	контроль	100	3.4	100	100	
	АБК	1	76.9	2.8	69.2	90
		5	18.2	1.0	18.2	-
		10	26.7	1.5	26.7	-
	Аргинин	100	46.2	2.0	46.2	66.7
		200	53.3	3.0	53.3	-
15/01	контроль	90.9	2.1	90.9	100	
	АБК	1	30.8	1.7	30.8	75
		5	12.5	1.0	12.5	-
		10	0.0	-	0.0	-
	Аргинин	100	86.7	3.3	86.7	84.6
		200	87.5	4.0	87.5	21.4

4. Blakesley D., Pask N., Henshaw G.G., Fay M.F. // *Plant Growth Regulation*. 1996. No. 20. pp.11-16.
5. Матушкина О.В., Пронина И.Н. // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. 2016. №5. С. 31-37.
6. Ташматова Л.В., Высоцкий В.А. // «Молодые ученые - садоводству России в XXI веке», сборник научных работ по материалам всероссийской научно-практической конференции. 11-12 октября 2007 г., Москва, 2008. с. 385-389.
7. Дунаева С. Е., Гавриленко Т.А. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 161. С. 10-19.
8. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. 2016. Вып. 120. С. 17-23.
9. Концевая И.И. // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. №7. С. 11-16.
10. Видягина Е.О., Шестибратов К.А. Патент РФ №2522823, 2012.
11. Capuana M., Lonardo S.D. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2013. Vol. 49, pp. 605-610.
12. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев, Аграрная наука, 2011, 344 с.
13. Крицкая Т.А., Кашин А.С. // Известия саратовского университета. Новая серия. Серия: химия. биология. экология. 2013. Т 13. № 4. С. 65-72.
14. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Внукова Н.И. // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. № 3. С. 57-67.
15. Машкина О.С., Шабанова Е.А., Вариводина И.Н. // *Лесн. журн*. 2019. № 6. С. 25–38.
16. Внукова Н.И. Табацкая Т.М., Машкина О.С. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. 2016. Вып. 18. С. 28-34.
17. Внукова Н.И. // «Экологические и биологические основы повышения продуктивности и устойчивости природных и искусственно возобновленных лесных экосистем», сборник трудов конференции, 04-06 октября 2018 г., Воронеж, 2018, с. 492-498.
18. Царев А. П., Погиба С.П., Тренин В.В. Селекция и репродукция лесных древесных пород. Москва, Логос, 2001, 520 с.
19. Царев А.П., Царева Р.П., Царев В.А. // «Биотехнология, генетика, селекция в лесном и сельском хозяйстве, мониторинг экосистем», сборник трудов конференции, 21-22 июня 2017 г., Воронеж, 2017, с. 229-234.
20. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A., Fladung M., Wühlisch G. // *Silvae Genetica*. 2018. Vol. 67. No. 1-2. pp. 12-19.
21. Шабанова Е.А. Машкина О.С. // Лесохозяйственная информация. 2015. № 4. С. 74-81.
22. Lloyd G., McCown D. // *Plant Propagators Soc. Comb. Proc*. 1980. pp. 421-427.
23. Shimelis D., Bantte K., Feyissa T. // *Adv. Crop. Sci. Tech*. 2015. Vol. 3, Is. 4.
24. Thimmappaiah, Shirly R.A., Sadhana P.H. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2002. Vol. 38. Is. 2, pp 152–156.
25. Pan M.J., Staden J. van // *Plant Growth Regulation*. 1998. Vol. 26, pp.155–163.
26. Thomas T.D. // *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 26. Is. 6. pp. 618-631.
27. Fathy H.M. // *Journal of Applied Sciences Research*. 2012. Vol. 8. No. 3. pp. 1373-1382.
28. Скапцов М.В., Куцев М.Г. // «Биотехнология и общество в XXI в.», сборник статей Международной научно-практической конференции, 15-18 сентября 2015 г., Барнаул, 2015, с. 398-400.
29. Соболева Г.В. // Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». 2013 г. №1(5). С. 8-15.
30. Шабанова Е.А., Внукова Н.И. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. 2019. Вып. 21. С. 242-247.
31. Шугаев А.Г., Буцанец П.А., Андреев И.М., Шугаева Н.А. // *Физиология растений*. 2014. Т. 61. No 4. С. 555.
32. Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M., Day D.A. // *Plant Physiol*. 2004. Vol. 134. pp. 492–501.
33. Barand A., Nasibi F., Manouchehri Kalantari Kh. // *Russ. Agricult. Sci*. 2015. Vol. 41, pp. 340–346.
34. Kassim N.E., Abou Rayya S.M., Ibrahim I.A., Ali E.A.M. // *Journal of Applied Sciences Research*. 2012. Vol. 8. No.6, pp. 3032-3037.
35. Яблонская М.И., Романова Е.В., Книшкайте А.В. // «Актуальные проблемы развития науки и образования», сборник трудов конференции, 05 мая 2014 г., Москва, 2014, с. 124-125.

Шабанова Е. А., Внукова Н. И., Машкина О. С.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики и биотехнологии»

\* Шабанова Е. А. научный сотрудник лаборатории биотехнологии,

E-mail: katy-green2009@yandex.ru

Внукова Н. И., научный сотрудник лаборатории биотехнологии,

E-mail: natalya.vnuckova@yandex.ru

Воронежский государственный университет  
Машкина О. С., кандидат биологических наук,  
доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

E-mail: mashkinaos@mail.ru

All-Russian Research Institute of Forest Genetics,  
Breeding and Biotechnology

\* Shabanova E. A., researcher of the Laboratory of Biotechnology,

E-mail: katy-green2009@yandex.ru

Vnukova N. I., researcher of the Laboratory of Biotechnology,

E-mail: natalya.vnuckova@yandex.ru

Voronezh State University  
Mashkina O. S., PhD., Associate Professor, Dept. of genetics, cytology and bioengineering

E-mail: mashkinaos@mail.ru

## INFLUENCE OF MODIFICATIONS IN THE COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIA ON THE EFFECTIVENESS OF *IN VITRO* LONG-TERM STORAGE OF POPLAR AND ASPEN CLONES

E. A. Shabanova<sup>1</sup>, N. I. Vnukova<sup>1</sup>, O. S. Mashkina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology

<sup>2</sup> Voronezh State University

**Abstract.** Maintaining *in vitro* collections is an effective way to preserve forest genetic resources. All-Russian Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology has created a collection of valuable genotypes of deciduous woody plants. Methods for increasing the period of non-stop storage and preserving the regenerative potential of clones are being developed. The purpose of this work is to test nutrient media with various supplements (osmotics, retardants, adsorbents, growth regulators, amino acids) for storing microplants of new clones of poplar and aspen in conditions of low positive temperature, low light, and a short photoperiod.

The results of *in vitro* storage of 11 clones of various species and hybrids of poplar and aspen (*P. alba* L., *P. alba* L. × *P. tremula* L., *P. alba* L. × *P. bolleana* Lauche, *P. tremula* L.) at a temperature of +4±2°C, light intensity of 0.5 klux, a photoperiod of 6 h day/18 h night for 12 months are presented. Modified nutrient medium Woody Plant Medium with half a set of macrosalts (½ WPM) was used. 6 variants of nutrient media were selected that allow storing crops with high safety (75-100%). The rootability of microshoots on experimental media varied from 85.0 (salicylic acid 1 mg/l) to 98.2% (activated carbon 15 g/l). The greatest average of roots number (4.0) was obtained on media supplemented with chlorocholine chloride. Low rooting and strong inhibition of microshoots growth were observed on media with abscisic acid and arginine. The recovery of growth of these cultures was 2-3 times slower compared to the control.

The best results were obtained on ½ WPM medium with the addition of activated carbon 15 g/l or polyvinylpyrrolidone 150 mg/l at a temperature of +4±2°C, low light (0.5 klux), a short photoperiod (6 h day/18 h night) for 12 (safety 97-100%) or 18 months (83-86%) of culture storage. These media are recommended for *in vitro* long-term storage of aspen, white poplar, hybrids of white poplar and aspen, hybrids of white and Bolle's poplar.

**Keywords:** long-term storage, *in vitro*, poplar, aspen, osmotics, retardants, adsorbents, growth regulators, activated carbon, polyvinylpyrrolidone

### REFERENCES

1. Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Rome, IPGRI Handbook for Genebanks, 2004, No. 7, p. 106.
2. Confalonieri M., Bisoffi S., Balestrazzi A., Carbonera D. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2003, Vol. 72, pp. 109–138.
3. Šijačić-Nikolić M., Milovanović J., Nonić M., Biotechnology and Biodiversity, 2014, pp. 103–128.

4. Blakesley D., Pask N., Henshaw G.G., Fay M.F., *Plant Growth Regulation*, 1996, No. 20, pp.11-16.
5. Matushkina O.V., Pronina I.N. *Tekhnologii pishchevoi i pererabatyvayushchei promyshennosti APK-produkty zdorovogo pitaniya*, 2016, No5, pp. 31-37.
6. Tashmatova L.V., Vysotskii V.A. «Molodye uchenye - sadovodstvu rossii v XXI veke», *Proceedings of the all-Russian scientific-practical conference, october 11-12, 2007, Moscow, 2008*, pp. 385-389.
7. Dunaeva S. E., Gavrilenko T.A., *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i seleksii*, 2007, Vol. 161, pp. 10-19.
8. Molkanova O.I., Konovalova L.N., Stakheeva T.S., *Byulleten gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada*, 2016, Vol. 120, pp. 17-23.
9. Kontsevaya I.I., *Byulleten' nauki i praktiki*, 2018, Vol. 4, No. 7, pp. 11-16.
10. Vidyagina E.O., Shestibratov K.A. Patent RF, no. 2522823, 2012.
11. Capuana M., Lonardo S.D., *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2013, Vol. 49, pp. 605-610. DOI: 10.1007/s11627-013-9536-6.
12. Mitrofanova I.V. *Somaticheskij jembriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii poluchenija i sohraneniya mnogoletnih sadovyh kul'tur*. Kiev: Agrarnaja nauka Publ., 2011, 344 p.
13. Kritskaya T.A., Kashin A.S., *Izvestiya saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: khimiya. biologiya. Ekologiya*, 2013, Vol 13, № 4, pp. 65-72.
14. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Vnukova N.I., *Biotekhnologiya*, 2019, Vol. 35, No. 3, pp. 57-67.
15. Mashkina O.S., Shabanova E.A., Varivodina I.N., Grodetskaia T.A. *Lesnoy Zhurnal [Russian Forestry Journal]*, 2019, No. 6, pp. 25–38. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2019.6.25.
16. Vnukova N.I. Tabatskaya T.M., Mashkina O.S. *Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biokhimicheskikh protsessov*, 2016, Vol. 18, pp.28-34.
17. Vnukova N.I. «*Ekologicheskie i biologicheskie osnovy povysheniya produktivnosti i ustoichivosti prirodnykh i iskusstvenno vozobnovlennykh lesnykh ekosistem*», *Proceedings of the Conference, October 4-6, 2018, Voronezh*, 2018, pp. 492-498.
18. Tsarev A. P., Pogiba S.P., Trenin V.V. *Selektsiya i reproduktsiya lesnykh drevesnykh porod*. Moskva, Logos Publ., 2001, 520 p.
19. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A. «*Biotekhnologiya, genetika, selektsiya v lesnom i sel'skom khozyaistve, monitoring ekosistem*», *Proceedings of the Conference, June 21-22, 2017, Voronezh*, 2017, pp. 229-234.
20. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A., Fladung M., Wühlisch G., *Silvae Genetica*, 2018, Vol. 67, No. 1-2, pp. 12-19.
21. Shabanova E.A. Mashkina O.S., *Lesokhozyaistvennaya informatsiya*, 2015, No. 4, pp. 74-81.
22. Lloyd G., McCown D., *Plant Ptopagators Soc. Comb. Proc.*, 1980, pp. 421-427.
23. Shimelis D., Bantte K., Feyissa T., *Adv. Crop. Sci. Tech.*, 2015, Vol. 3, Is. 4. DOI: 10.4172/2329-8863.1000184.
24. Thimmappaiah, Shirly R.A., Sadhana P.H., *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2002, Vol. 38, Is. 2, pp 152–156.
25. Pan M.J., Staden J. van, *Plant Growth Regulation*, 1998, Vol. 26, pp.155–163.
26. Thomas T. D., *Biotechnology Advances*, 2008, Vol. 26, Is. 6, pp. 618-631.
27. Fathy H.M., *Journal of Applied Sciences Research*, 2012, Vol. 8, No. 3, pp. 1373-1382.
28. Skaptsov M.V., Kutsev M.G. «*Biotekhnologiya i obshchestvo v XXI v.*», *Proceedings of the International scientific-practical conference, September 15-18, 2015, Barnaul*, 2015, pp. 398-400.
29. Soboleva G.V. *Nauchno-proizvodstvennyi zhurnal «Zernobovye i krupyanye kul'tury»*, 2013, No 1(5), pp. 8-15.
30. Shabanova E.A., Vnukova N.I., *Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biokhimicheskikh protsessov*, 2019, Vol. 21. pp. 242-247.
31. Shugaev A.G., Butsanets P.A., Andreev I.M., Shugaeva N.A., *Fiziologiya rastenii*, 2014, T. 61, No 4, pp. 555.
32. Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M., Day D.A., *Plant Physiol.*, 2004, Vol. 134, pp. 492–501. DOI: 10.1104/pp.103.031039.
33. Barand A., Nasibi F., Manouchehri Kalantari Kh., *Russ. Agricult. Sci.*, 2015, Vol. 41, pp. 340–346. DOI: 10.3103/S1068367415050043.
34. Kassim N.E., Abou Rayya S.M., Ibrahim I.A., Ali E.A.M., *Journal of Applied Sciences Research*, 2012, Vol. 8, No.6, pp. 3032-3037.
35. Yablonskaya M.I., Romanova E.V., Knishkaite A.V. «*Aktual'nye problemy razvitiya nauki i obrazovaniya*», *Proceedings of the conference, may 5, 2014, Moskva*, 2014, pp. 124-125.