

УДК 630.181.51:58.085

DOI: 10.17238/issn0536-1036.2019.6.25

**ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ РАЗМНОЖЕННЫХ *IN VITRO* КЛОНОВ
ОСИНЫ (*Populus tremula L.*):
РОСТ, ПРОДУКТИВНОСТЬ, КАЧЕСТВО ДРЕВЕСИНЫ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ**

О.С. Машкина^{1,2}, канд. биол. наук, доц.; ResearcherID: [H-7362-2014](#),

ORCID: [0000-0001-8252-2192](#)

Е.А. Шабанова¹, науч. сотр.; ORCID: [0000-0003-3795-2702](#)

И.Н. Вариводина¹, канд. техн. наук, доц.; ResearcherID: [H-9040-2017](#),

ORCID: [0000-0002-0351-8898](#)

Т.А. Гродецкая^{1,2}, мл. науч. сотр., аспирант; ResearcherID: [S-8770-2019](#),

ORCID: [0000-0002-5448-2792](#)

¹Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, ул. Ломоносова, д. 105, г. Воронеж, Россия, 394087; e-mail: mashkinaos@mail.ru, katu-green2009@yandex.ru, varivodinna@rambler.ru, tatyana.pokusina@yandex.ru

²Воронежский государственный университет, Университетская площадь, д. 1, г. Воронеж, Россия, 394018; e-mail: mashkinaos@mail.ru, tatyana.pokusina@yandex.ru

Широкое внедрение в лесокультурное производство высокопродуктивных и гнилеустойчивых форм и гибридов осины (*Populus tremula L.*) сдерживается отсутствием эффективных методов их вегетативного размножения. Достижения современной лесной биотехнологии позволяют проводить клонирование *in vitro* экономически ценных генотипов осины и получать посадочный материал для плантационного лесовыращивания. Изучение особенностей проявления ценных признаков и генетической стабильности размноженных *in vitro* клонов в полевых условиях (*ex vitro*) важно для разработки эффективных и надежных методов клонирования, гарантирующих сохранение генетической и хозяйственной ценности материнских деревьев для их устойчивого и целевого воспроизводства. Представлены результаты оценки генетической стабильности, динамики роста, продуктивности и качества древесины трех размноженных *in vitro* клонов осины (6/3, 15/01 и 20/4) в полевых условиях. Микроразмножение осуществляли путем прямого органогенеза с использованием безгормональных питательных сред, что способствовало уменьшению вероятности возникновения соматоклональной изменчивости при культивировании *in vitro*. По итогам 17-летних полевых испытаний клоны демонстрируют хороший рост и достаточно высокую продуктивность древостоев, сохраняют ростовые особенности материнских деревьев, не проявляют признаков соматоклональной изменчивости. В возрасте 17 лет средняя высота деревьев составила 18...20 м; диаметр ствола – 25...30 см; объем ствола – 0,391...0,553 м³; запас древесины на 1 га при размещении деревьев 4×4 м и сохранности 44...71 % – 111...227 м³/га. Выявлена высокая генетическая стабильность клонов (по микросателлитным локусам, уровню пloidности и миксопloidии) в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Показано, что более высокой сохранностью и лучшими показателями качества древесины (по плотности и длине волокна) отличается трипloidный клон 15/01, имеющий выраженную миксопloidную природу. Это может быть связано с оптимальным сбалансированным соотношением у него клеток разного уровня пloidности (трипloidных, диплоидных и анеупloidных), которое обеспечивает наиболее эффективную экспрессию генов в конкретных условиях среды.

Для цитирования: Машкина О.С., Шабанова Е.А., Вариводина И.Н., Гродецкая Т.А. Полевые испытания размноженных *in vitro* клонов осины (*Populus tremula L.*): рост,

продуктивность, качество древесины, генетическая стабильность // Лесн. журн. 2019. № 6. С. 25–38. (Изв. высш. учеб. заведений). DOI: 10.17238/issn0536-1036.2019.6.25

Ключевые слова: *Populus tremula* L., клонирование *in vitro*, полевые испытания, хромосомный и микросателлитный анализ.

Введение

Осина, или тополь дрожащий (*Populus tremula* L.), является одной из широко востребованных в мире быстрорастущих и скороспелых древесных пород. Ее древесина используется для целлюлозно-бумажной промышленности, спичечного и фанерного производства, изготовления пиломатериалов, древесно-стружечных и ориентировано-стружечных плит, биотоплива и др. [6, 12, 18, 34]. Из-за своей влагостойкости и долговечности древесина осины ценится в строительстве. Благодаря высокой корнеотпрысковой способности, она быстро заселяет гари, вырубки, брошенные пашни, используется для укрепления оврагов, лесомелиорации пойм, полезащитного разведения и других целей. В России осина – лесообразующая порода, среди мягколиственных пород занимающая второе место по распространенности после березы.

Серьезным недостатком древесины осины, ограничивающим ее применение, является подверженность сердцевинной гнили, вызываемой осиновым трутовиком (*Phellinus tremulae* Bond. et Boris) [12], что приводит к фаутности насаждений и снижению выхода деловой древесины. Широкое же внедрение в лесокультурное производство отселектированных в природе или искусственно полученных быстрорастущих (в том числе триплоидных исполинских) высокопродуктивных гнилеустойчивых форм и гибридов сдерживается отсутствием эффективных методов их вегетативного размножения. Размножение взрослых экземпляров осины прививками и черенками трудоемко и малоэффективно. Осинники же порослевого происхождения (от корневых отпрысков) часто поражаются гнилью [5, 6].

Современные достижения лесной биотехнологии позволяют проводить клонирование *in vitro* ценных трудно размножаемых генотипов осины [1, 20, 22, 25, 30, 32, 38] и получать посадочный материал для плантационного лесовыращивания [3, 15, 19, 32]. Плантационное лесовыращивание с использованием быстрорастущих пород направлено на создание в кратчайшие сроки высокопродуктивных насаждений и удовлетворение потребности в сырье. Оно предполагает интенсивное лесопользование, позволяющее сохранять естественные леса [31]. Положительный опыт создания плантационных культур клонированным *in vitro* посадочным материалом ценных быстрорастущих и гнилеустойчивых генотипов осины имеется как за рубежом [7, 34, 36], так и в нашей стране [3, 5, 10].

Для ожидаемого лесоводственного и экономического эффекта предлагаемые биотехнологические разработки перед внедрением должны проходить опытно-производственную проверку. Примеры селекционной оценки микро-размноженных клонов в полевых условиях немногочисленны. Так, было показано, что в Республике Татарстан размноженные *in vitro* клоны триплоидной осины в возрасте 4 лет росли вдвое быстрее диплоидных [3]. Исследование хода роста 8-летних культур триплоидной осины в Ленинградской области выявило, что скорость роста определяется категорией лесного участка, лесорас-

тительными условиями и способом обработки почвы [5]. Сходные результаты получены в Беларуси при изучении сохранности и динамики роста быстрорастущего клона осины в возрасте 1–6 лет [7]. Исследователи из Финляндии [28] продемонстрировали преимущества летней посадки микроклонов осины в теплицу по сравнению с весенней и осенней. Латвийские ученые показали, что рост микроразмноженных клонов осины в значительной степени зависит от их генетических свойств. Так, продуктивность клонов гибридной осины (*P. tremula* L. × *Populus tremuloides* Minchx.) была в 2,5 раза выше по сравнению с осинкой обыкновенной (*P. tremula* L.) [36].

Тем не менее еще недостаточно изучены особенности проявления ценных признаков, а также генетическая стабильность размноженных *in vitro* клонов в полевых условиях (*ex vitro*). Это важно для разработки эффективных и надежных методов клонального микроразмножения различных генотипов осины, гарантирующих сохранение генетической и хозяйственной ценности материнских деревьев для их устойчивого и целевого воспроизводства.

Опытные плантационные культуры продуктивных и гнилеустойчивых биотипов осины были заложены нами в 2001 г. в Воронежской области [11]. Их возраст в настоящее время – 19 лет (после высадки микрорастений в полевые условия). Это самые старые культуры осины в России, созданные на основе клонального микроразмножения.

Цель исследования – оценка динамики роста, продуктивности, качества древесины и генетической стабильности размноженных *in vitro* клонов осины в полевых условиях для подтверждения возможности использования этой технологии для выращивания посадочного материала и создания продуктивных плантационных культур целевого назначения.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили опытные плантационные культуры трех размноженных *in vitro* клонов осины (6/3, 15/01 и 20/4), созданные регенерантами в Семилукском лесопитомнике Воронежской области в 2001 г. Всего 234 растения. Размещение посадочных мест 4×4 м, в трех повторностях. Исходные деревья отобраны Ю.Н. Исаковым по продуктивности, прямизне ствола и устойчивости к гнили в тремелетуме Семилукского питомника, заложенном В.П. Петрухновым в 1973–1975 гг. прививкой лучших исполинских клонов осины из Латвии, Воронежской (клоны X₄ (15/01) и X₆ (6/3)), Курской (клон 20/4), Костромской и других областей [11, 18].

Регенерацию растений в культуре *in vitro* осуществляли путем прямого органогенеза из одноузловых эксплантов летних неодревесневших побегов по разработанной нами методике [11]. Для уменьшения вероятности возникновения соматоклональной изменчивости на этапах клонирования *in vitro* и хранения коллекции использовали питательную среду WPM (или 1/2 WPM) [27] без гормонов с добавлением активированного угля (1,5 %). Микрорастения в почвенный субстрат (торф : песок – 1 : 1) переводили путем прямой высадки микрорастений из пробирочной культуры в теплицу (рис. 1), где их доращивали в течение двух лет.

Анализ сохранности и хода роста клонов осины проводили в многолетней динамике в интервале 3–17 лет (2003–2009, 2014 и 2017 гг.). Объем стволов

определяли по объемным таблицам для тополя [24]. Запас древесины, который является наиболее значимым показателем производительности древостоев, поскольку характеризует быстроту их роста как в высоту, так и по диаметру [18], вычисляли с учетом фактической сохранности клонов.



Рис. 1. Общий вид микроразмноженных растений осины в условиях *in vitro* (а) и *ex vitro* в теплице (б) и питомнике в возрасте 14 (в) и 17 лет (з, д)

Fig. 1. Micropropagated plants of aspen *in vitro* (a) and *ex vitro* in the green house (б) and nursery at the age of 14 (в) and 17 (з, д)

Генетическую стабильность оценивали по данным хромосомного и микросателлитного анализа растений одних и тех же клонов, находящихся в коллекции *in vitro*, высаженных в питомник (полевые условия), в сравнении с их материнскими деревьями. Число хромосом и уровень миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модального диплоидного ($2n = 2x = 38$) или триплоидного ($2n = 3x = 57$) набора хромосом) определяли в меристеме кончиков корешков микрорастений (*in vitro*) или молодых листьев из распускающихся почек вегетирующих растений (*ex vitro*). Давленные препараты, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по методике [16]. Просмотр микропрепаратов осуществляли на микроскопе «Микмед 6» при увеличении $40\times 1,5\times 10$ и $100\times 1,5\times 10$. Для микрофотосъемки использовали цифровую камеру окуляра DCM500. Критерием для отнесения растения к тому или иному

уровню плоидности являлось преобладание (свыше 60 %) клеток с определенным числом хромосом.

Экстракцию ДНК осуществляли СТАВ-методом [21], генетическую паспортизацию образцов – по 5 высокополиморфным ядерным SSR-локусам: PTR5, PTR7, PTR8, PTR12, PTR14 [33]. Полимеразно-цепную реакцию проводили на приборе Gene Max Tc-s. Параметры амплификации: 94 °C – 3 мин; 94 °C – 20 с; 55 °C – 20 с; 72 °C – 20 с.

Качество древесины оценивали по ее плотности и структурным характеристикам древесинных волокон. Базисную плотность древесины определяли способом максимальной влажности, разработанным для образцов небольшого объема. Плотность древесины в абс. сухом состоянии оценивали стереометрическим методом [13]. Для определения структурных характеристик древесинных волокон проводили мацерацию образцов методом Франклина [26]. Длину и диаметр древесинных волокон измеряли на микроскопе Carl Zeiss Axio Vert A1 при помощи программы Zen в 100-кратной повторности для каждого образца. Сердцевинную гниль диагностировали визуалью на кервах (отобрано 98 шт.), заготовленных с помощью возрастного бурава в комлевой части дерева на высоте 1,3 м.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценку сохранности и роста размноженных *in vitro* клонов осины проводили в полевых условиях в многолетней динамике (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1

Показатели роста и продуктивности размноженных *in vitro* клонов осины в возрасте 17 лет

Клон	Сохранность, %	Высота, м	Диаметр, см	Объем ствола м ³	Запас древесины, м ³ /га	
					<i>in vitro</i> клонов	исходных деревьев**
6/3	65,8	19,7 ± 0,2	29,6 ± 0,8	0,553	227,4	644,0
15/01	71,4	19,2 ± 0,2	25,1 ± 0,3*	0,391	174,4	434,0
20/4	44,4	18,0 ± 0,1*	26,0 ± 0,5*	0,401	111,3	322,0

Примечание. *Различия с клоном 6/3 по высоте и диаметру достоверны при $P < 0,01$.

**Запас древесины исходных деревьев в возрасте 40 лет по данным [18].

Глобальное изменение климата привело к увеличению числа засух в центральной части России, которые оказали негативное влияние и на древесные растения. Приживаемость микроклонов в полевых условиях (в год слабой засухи) была достаточно высокой (70...98 %). Наибольшее количество усохших деревьев было отмечено после аномально жаркого и сухого 2010 г. Засуху 2010 г. относят к годам климатического экстремума, когда погодный стресс превысил адаптивную норму реакции [8]. Сохранность клонов к 17-летнему возрасту составила от 44 (клон 20/4) до 71 % (клон 15/01).

На протяжении всего периода изучения лучшим ростом в высоту отличались клоны 6/3 и 15/01. Первые 8 лет после высадки растений в питомник лидировал клон 6/3, статистически достоверно отличаясь по высоте от клонов 15/01 и 20/4. В возрасте 9–17 лет клон 6/3 лидировал и по диаметру ствола. Сходная динамика роста отмечена и у материнских деревьев в возрасте 40 лет [18] (табл. 1).

В возрасте 17 лет средняя высота клонов составила 18...20 м, диаметр ствола – 25...30 см; объем ствола – 0,391...0,553 м³; запас древесины на 1 га при размещении деревьев 4×4 м и сохранности 44...71 % – 111...227 м³/га. Причем на протяжении первых 5 лет размноженные *in vitro* клоны характеризовались лучшим ростом и более высокой внутриклоновой однородностью (коэффициент вариации по высоте – 4...7 %, диаметру – 10...19 %) по сравнению с корнесобственными деревьями (семенного происхождения), произрастающими на этом же участке [11].

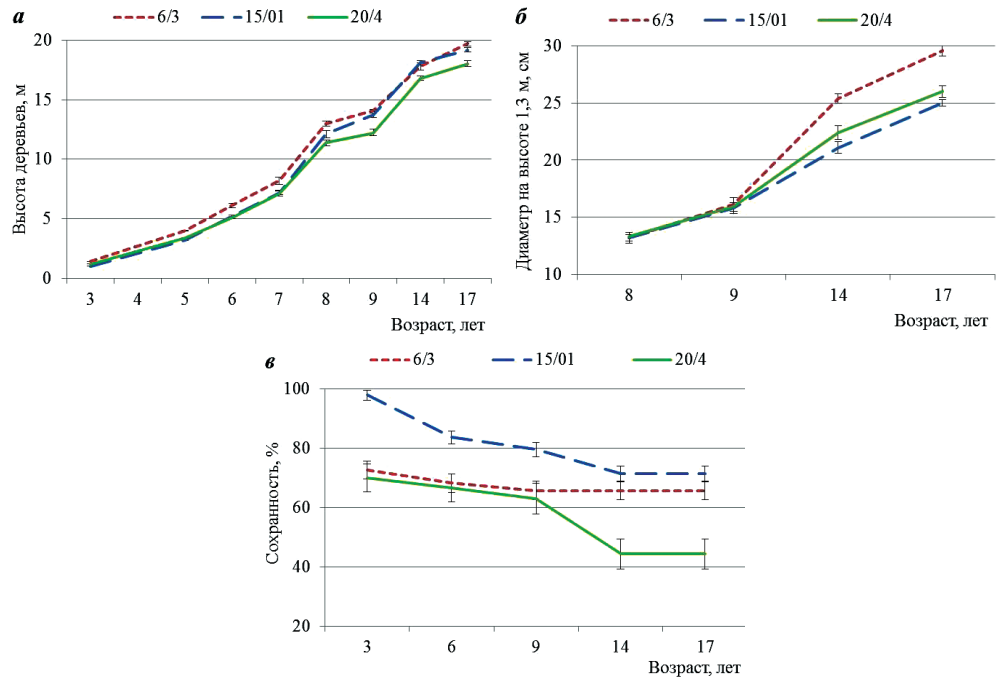


Рис. 2. Динамика роста в высоту (а) и по диаметру (б), сохранности (в) размноженных *in vitro* клонов осины в полевых условиях

Fig. 2. Dynamics of height (a) and diameter growth (б), and survivability (в) of propagated aspen clones *in vitro* in the field

Количественная спелость осиновых лесов наступает к 25–30 годам, техническая – к 35. Так, в 24-летнем возрасте средняя высота лучших форм и гибридов осины в Воронежской области достигает 16,5...25,0 м, диаметр на высоте груди – 20...38 см, объем ствола – 0,3...0,9 м³ [18]. Высота гибридных клонов осины в возрасте 18 лет в условиях Латвии составляет 21,6±0,84 м, объем ствола – 0,32 м³ [37].

Таким образом, по итогам 17-летних полевых испытаний размноженные *in vitro* клоны осины демонстрируют хороший рост и достаточно высокую продуктивность древостоев, характеризуются внутриклоновой однородностью по росту, сохраняют ростовые особенности материнских деревьев, не проявляют признаков соматоклональной изменчивости.

При оценке качества древесины осины большое значение имеет ее плотность, которая коррелирует с механическими свойствами древесины [36]. Этот показатель используют для прогнозирования свойств бумаги и древесно-стружечных плит. Плотность древесного сырья определяет выход целлюлозы [13].

В производстве целлюлозы, бумаги и других продуктов переработки древесины большое значение придается длине и толщине древесинных волокон. Так, повышенная длина волокна является одним из важных показателей пригодности древесины для бумажного производства.

Известно, что у осины относительно плотная древесина формируется к возрасту 20–25 лет [13]. Длина ее волокон находится в диапазоне 0,55...1,60 мм [17].

Как следует из табл. 2, древесина размноженного *in vitro* клона 15/01 уже в возрасте 17 лет обладает близкими к контролю (к справочным значениям для древесины осины, произрастающей в Центральном районе европейской части России) показателями плотности. Средняя плотность древесины в абс. сухом состоянии у клона 15/01 составляет 439 кг/м³ (против 455 кг/м³ в контроле), базисная – 383 кг/м³ (против 389 кг/м³ в контроле). Этот же клон характеризуется более длинными (по сравнению с клонами 6/3 и 20/4) волокнами – 1,73±0,07 мм (с варьированием от 1,23 до 2,35 мм) при среднем диаметре волокна 23,3±3,5 мкм (рис. 3).

Таблица 2

Показатели качества древесины размноженных *in vitro* клонов осины в возрасте 17 лет

Клон	Плотность древесины, кг/м ³		Структурные характеристики древесинных волокон, мм	
	в абс. сухом состоянии	базисная	Длина	Диаметр
6/3	392±5,6**	340±5,5**	1,30±0,06**	24,1±3,7
15/01	439±4,7	383±4,6	1,73±0,07	23,3±3,5
20/4	427±4,7	368±4,1*	1,37±0,09**	24,0±5,1

Примечание. Справочное значение плотности древесины осины, произрастающей в Центральном районе европейской части России: в абс. сухом состоянии $\rho_0 = 455$ кг/м³; базисная $\rho_6 = 389$ кг/м³ [13]. Различия с клоном 15/01 достоверны при $P^* < 0,5$; $P^{**} < 0,01$.

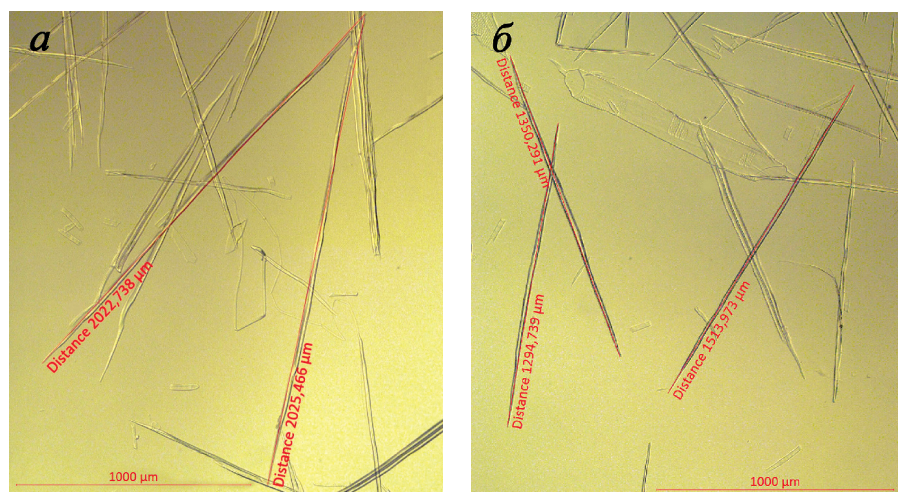


Рис. 3. Древесинные волокна (либриформа и волокнистых трахеид) размноженных *in vitro* клонов под световым микроскопом:
а – клон 15/01; б – клон 6/3

Fig. 3. Wood fibers (libriform and fibre tracheids) of propagated aspen clones *in vitro* under the light microscope: а – clone 15/01; б – clone 6/3

Нами отмечены возрастные изменения плотности древесины изученных клонов. Так, у клона осины 15/01 за 4 года (с 2014 по 2018 г.) базисная плотность увеличилась на 15 %, у клонов 20/4 и 6/3 – на 4 и 10 % соответственно. Можно прогнозировать дальнейшее увеличение плотности древесины с возрастом клонов.

Одной из самых опасных и распространенных болезней ствола осины, существенно понижающих качество древесины, является сердцевинная гниль. Поврежденность деревьев стволовой гнилью начинается со II класса возраста, достигая к 70...75 годам 100 % [1, 4, 6, 12, 18]. Зараженность деревьев трутовиком чаще всего определяют по наличию плодовых тел гриба, загнивающих и табачных сучьев на дереве и другим внешним признакам [1, 4, 12, 18]. Так, по данным Царева и др. [18], пораженность стволов трутовиком у осинников в лесах Центрально-Черноземного района во II классе возраста составляет 0,6 %, а в VII – 90,4 % [18].

При обследовании 17-летних деревьев, произрастающих на участке (234 шт.), плодовые тела трутовика нами не были выявлены. При визуальном осмотре изъятых образцов (98 кернов) отмечены признаки пораженности сердцевинной гнилью единичных деревьев клонов 6/3 и 20/04 (общий процент – 1,8 %) и их полное отсутствие у клона 15/01.

Повышенная длина волокна у клона 15/01, а также его более высокая (по сравнению с клонами 6/3 и 20/4) устойчивость к стволовой гнили, может быть связана с триплоидной природой ($2n = 57$). Триплоиды часто проявляют эффект гетерозиса [1, 23, 35] и отличаются высокой продуктивностью и устойчивостью [1]. У остальных клонов (которые оказались диплоидами, $2n = 38$) эти показатели были существенно ниже.

По данным хромосомного анализа микроразмноженный клон 15/01 (как и его материнское дерево) имеет миксоплоидную природу триплоид-диплоидного типа с преобладающим содержанием (64...66 %) в соматической ткани клеток с 57 хромосомами (табл. 3, рис. 4). Клон 15/01 демонстрирует цитологическую стабильность как в условиях *in vitro* (в коллекции), так и *ex vitro* (у 15-летних деревьев, произрастающих в питомнике). Об этом свидетельствует сохранение у него плоидности, уровня миксоплоидии (34...37 %) и соотношения триплоидных и диплоидных клеток в соматической ткани. Сходный уровень миксоплоидии был и у материнского дерева (33 %).

Таблица 3

Плоидность и уровень миксоплоидии размноженных *in vitro* клонов осины

Клон	Образец, место нахождения	Доля клеток с числом хромосом, %			Уровень миксоплоидии, %
		$2n = 38$	$2n = 57$	анеуплоидные	
6/3**	Коллекция <i>in vitro</i>	85,0	–	15,0	15,0±0,9
	Питомник	85,0	5,0	15,0	20,0±1,8
15/01	Материнское дерево, 40 лет	33,3	66,7	–	33,3
	Коллекция <i>in vitro</i>	32,7	63,7	3,6	36,3±1,2
	Питомник	34,1	65,9	–	34,1±0,9
20/4**	Питомник	92,7	–	7,3	7,3±0,8

Примечание. Возраст анализируемых деревьев в питомнике – 15 лет. Различия с клоном 15/01 по уровню миксоплоидии достоверны при **P < 0,01.

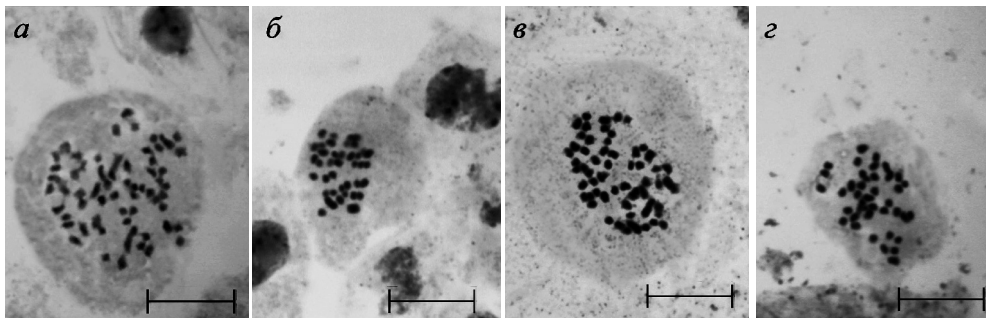


Рис. 4. Метафазные пластинки размноженного *in vitro* миксоплоидного клона осины 15/01 (а, б) и его материнского дерева (в, г) с триплоидным (модальным), $2n = 3x = 57$ (а, в) и диплоидным, $2n = 2x = 38$ (б, г) числом хромосом (масштабная линейка 10 мкм)

Fig. 4. Metaphase plates of propagated *in vitro* mixoploid aspen clone 15/01 (a, б) and its parent tree (в, г) with triploid (modal), $2n = 3x = 57$ (a, в) and diploid chromosome number, $2n = 2x = 38$ (б, г). Scale bar is 10 μm

У клонов 6/3 и 20/4 число хромосом оставалось диплоидным ($2n = 38$) с высоким преобладанием (85 и 95 % соответственно) клеток с 38 хромосомами. Они также имеют миксоплоидную природу, но уровень миксоплоидии у них в 2–4 раза ниже по сравнению с клоном 15/01 (табл. 3).

Миксоплоидия – одновременное присутствие в ткани организма клеток с различным уровнем плоидности – довольно распространена у растений. Особенно широко она встречается среди гибридов и полиплоидов [9]. Считают, что миксоплоидия за счет имеющегося у нее резерва клеток разного уровня плоидности способна повышать адаптивный потенциал растений, особенно в неблагоприятных условиях произрастания [2, 9, 14]. Адаптивность миксоплоидов нередко сочетается с их высокой продуктивностью.

Наиболее высокой (по сравнению с диплоидными клонами) сохранностью (особенно после сильной засухи 2010 г.) и лучшими показателями качества древесины (по плотности и длине волокна) отличается триплоидный клон 15/01, имеющий выраженную миксоплоидную природу (см. табл. 1 и 2). Это может быть связано с оптимальным сбалансированным соотношением у него клеток разного уровня плоидности (триплоидных, диплоидных и анеуплоидных), что обеспечивает наиболее эффективную экспрессию генов в конкретных условиях среды.

Как показали результаты наших предыдущих исследований на карельской березе, размноженной *in vitro* через каллусные культуры и имеющей признаки соматоклональной изменчивости [29], уровень миксоплоидии может изменяться в процессе длительного культивирования *in vitro* и влиять на проявление хозяйственно-ценных признаков (в частности, узорчатость древесины). В условиях настоящего эксперимента с осинкой, микроразмноженной путем прямого органогенеза, миксоплоидные клоны оставались цитологически стабильными как *in vitro*, так и *ex vitro*. Использование же питательных сред без гормонов на этапах хранения коллекции *in vitro* и микроклонирования уменьшало вероятность возникновения соматоклональной изменчивости и обеспечивало генетическую стабильность клонов и их внутрикловую однородность.

Это подтверждают и данные микросателлитного анализа растений одних и тех же клонов осины (15/01 и 6/3), находящихся в коллекции *in vitro* и произрастающих в питомнике (*ex vitro*) (табл. 4).

Таблица 4

**Генетические паспорта размноженных *in vitro* клонов осины,
построенные на основе микросателлитного анализа**

Клон	Образец, место нахождения	Локус, размер продукта				
		PTR8	PTR7	PTR5	PTR14	PTR12
6/3	Коллекция <i>in vitro</i>	130/130	243/251	247/253	197/203	256/265
	Питомник	130/130	243/251	247/253	197/203	256/265
15/01	Материнское дерево	140/140	230/238	254/254	197/200	256/256
	Коллекция <i>in vitro</i>	140/140	230/238	254/254	197/200	256/256
	Питомник	140/140	230/238	254/254	197/200	256/256

Высокая генетическая внутриклоновая однородность (не выявлены изменения в ДНК спектрах) проявляется по всем 5 проанализированным микросателлитным локусам. Кроме того, растения размноженного *in vitro* клона осины 15/01 демонстрируют генетическую идентичность их материнскому дереву.

Заключение

Результаты многолетних полевых испытаний размноженных *in vitro* клонов осины свидетельствуют о целесообразности использования разработанной нами технологии клонирования *in vitro* для выращивания посадочного материала селекционно-ценных биотипов осины (трудно размножаемых черенками и прививками) и создания продуктивных плантационных культур целевого назначения с гарантированным сохранением генетической и хозяйственной ценности исходных экземпляров. Это подтверждают данные изучения динамики роста и продуктивности размноженных *in vitro* клонов, качества древесины 17-летних деревьев, хромосомного и микросателлитного анализа одних и тех же клонов в культуре *in vitro* (в коллекции) и *ex vitro* (в питомнике) по сравнению с их материнскими деревьями.

Для получения ожидаемого эффекта от использования технологии *in vitro* предлагаем микроразмножение осины проводить на основе ранее созданной коллекции *in vitro* ценных генотипов (пробирочных растений в асептической культуре). Это ускоряет и упрощает процесс вегетативного размножения осины за счет исключения трудоемкого начального этапа получения асептических морфогенных культур, поддержания ювенильности и регенерационной способности культур взрослых материнских деревьев. Использование же безгормональных питательных сред (WPM или 1/2 WPM) и модели размножения (путем активации пазушных меристем) на этапах поддержания коллекции *in vitro* и клонирования осины способствует уменьшению вероятности соматической изменчивости и обеспечивает генетическую стабильность и внутриклоновую однородность клонированного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Багаев Е.С., Багаев С.С., Макаров С.С., Чудецкий А.И. Перспективы плантационного выращивания быстрорастущих триплоидных клонов осины в южно-таежном лесном районе европейской части России // Вест. Тюмен. гос. ун-та. Экология и природопользование. 2018. Т. 4, № 3. С. 81–93. [Bagaev E.S., Bagaev S.S., Makarov S.S., Chudetskiy A.I.]

detsky A.I. Prospects for Plantation Growing Fast-Growing Triploid Clones of Aspen in the Southern Taiga Forest Area of the European Part of Russia. *Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya i prirodopol'zovaniye* [Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology], 2018, vol. 4, no. 3, pp. 81–93]. DOI: [10.21684/2411-7927-2018-4-3-81-93](https://doi.org/10.21684/2411-7927-2018-4-3-81-93)

2. Буторина А.К. Факторы эволюции кариотипов древесных // Успехи современной биологии. 1989. № 3(6). С. 342–357. [Butorina A.K. Factors of Karyotypes Evolution in Woody Plants. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Biology Bulletin Reviews], 1989, no. 3(6), pp. 342–357].

3. Газизуллин А.Х., Гарипов Н.Р., Пуряев А.С., Ятманова Н.М., Хакимова З.Г., Чернов В.И., Исмагилов Р.И. Результаты исследования четырехлетних опытных культур осины, созданных в Республике Татарстан методами биотехнологии // Вестн. Казан. ГАУ. 2011. № 3(21). С. 118–120. [Gazizullin A.Kh., Garipov N.P., Puryaev A.S., Yatmanova N.M., Khakimova Z.G., Chernov V.I., Ismagilov R.I. Four-Year Results of Experimental Cultures of Aspen Established by Tatarstan Biotechnology. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Vestnik of Kazan State Agrarian University], 2011, no. 3(21), pp. 118–120].

4. Гуров А.Ф., Фокин В.Н. Основные пороки древесины осины и березы и их влияние на выход деловой древесины // Лесн. вестн. 2000. № 4. С. 92–94. [Gurov A.F., Fokin V.N. The Main Defects of Aspen and Birch Wood and Their Influence on the Commercial Timber Output. *Lesnoy vestnik* [Forestry Bulletin], 2000, no. 4, pp. 92–94].

5. Жигунов А.В., Шабунин Д.А., Бутенко О.Ю. Лесные плантации триплоидной осины, созданные посадочным материалом *in vitro* // Вестн. Поволж. гос. технол. ун-та. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2014. № 4(24). С. 21–30. [Zhigunov A.V., Shabunin D.A., Butenko O.Yu. Triploid Aspen Forest Plantations of *in vitro* Planting Material. *Vestnik PGTU. Ser. «Les. Ekologiya. Prirodopolzovanie»* [Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management], 2014, no. 4(24), pp. 21–30].

6. Иванников С.П. Быстрорастущая и устойчивая к гнили форма осины // Лесн. хоз-во. 1952. № 12. С. 37–38. [Ivannikov S.P. Fast-Growing and Rot-Resistant Aspen Species. *Lesnoye khozyaystvo*, 1952, no. 12, pp. 37–38].

7. Кодун-Иванова М.А., Кулагин Д.В. Рост лесных культур осины на вырубке и в условиях деградированных лесных земель // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века: материалы 18-й междунар. науч. конф., 17–18 мая 2018 г., г. Минск, Республика Беларусь: в 3 ч. Минск: ИВЦ Минфина, 2018. Ч. 3. С. 45–46. [Kodun-Ivanova M.A., Kulagin D.V. Growth of Forest Crops of Australia on Felling and in the Conditions of Degraded Forest Land. *Proceedings of the 18th International Scientific Conference “Sakharov Readings 2018: Environmental Problems of the XXI Century”, May 17–18, 2018, Minsk, Belarus*. Minsk, Minfin Publ., 2018, part 3, pp. 45–46].

8. Кузнецова Н.Ф. Развитие неспецифической и специфической реакций у *Pinus sylvestris* L. на популяционном уровне в стрессовом градиенте засушливых лет // Экология. 2015. № 5. С. 332–338. [Kuznetsova N.F. Development of Specific and Nonspecific Responses to Stress in *Pinus sylvestris* L. at Population Level in a Gradient of Drought Years. *Ekologiya* [Russian Journal of Ecology], 2015, no. 5, pp. 332–338]. DOI: [10.1134/S1067413615050136](https://doi.org/10.1134/S1067413615050136)

9. Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Минск: Право и экономика. 2011. Т. 12. С. 7–14. [Kunakh V.A. Genome Plasticity of Somatic Cells and Plant Adaptability. *Molecular and Applied Genetics: Collection of Academic Papers*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2011, no. 12, pp. 7–14].

10. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А. Широкомасштабное клональное микроразмножение декоративных и лесных культур // Проблемы и перспективы развития современной ландшафтной архитектуры: материалы Всерос. науч.-практ.

- конф. с междунар. участием, 25–28 сент. 2017 г. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2017. С. 189–192. [Lebedev V.G., Azarova A.B., Shestibratov K.A. Large-Scale Clonal Micropropagation of Ornamental and Forest Crops. *Problems and Prospects of Development of Modern Landscape Architecture: Materials of the Scientific Conference*. Simferopol, PP “ARIAL” Publ., 2017, pp. 189–192].
11. Машикина О.С., Исаков Ю.Н. Микрклональное размножение хозяйственно ценных генотипов осины // Сохранение, изучение и воспроизводство генетических ресурсов лесных древесных растений: сб. науч. тр. Воронеж, 2007. С. 47–58. [Mashkina O.S., Isakov Yu.N. Microclonal Propagation of Economically Valuable Genotypes of Aspen. *Preservation, Study and Reproduction of Genetic Resources of Forest Woody Plants: Collection of Academic Papers*. Voronezh, 2007, pp. 47–58].
12. Михайлов Л.Е. Осина. М.: Агропромиздат, 1985. 72 с. [Mikhaylov L.E. *Aspen*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1985. 72 p.].
13. Полубояринов О.И. Плотность древесины. М.: Лесн. пром-сть, 1976. 160 с. [Poluboyarinov O.I. *The Density of Wood*. Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1976. 160 p.].
14. Седельникова Т.С. Изменчивость размера генома хвойных в экстремальных условиях произрастания // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 5. С. 514–528. [Sedel'nikova T.S. Variability of Genome Size in Conifers under Extreme Environmental Conditions. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Biology Bulletin Reviews], 2015, no. 135(5), pp. 514–528].
15. Столярова Н.А. Выращивание посадочного материала триплоидной осины, полученного по технологии *in vitro* и закладка плантаций // Изв. СПбЛТА. 2010. Вып. 193. С. 62–71. [Stolyarova N.A. Growing Seedlings Triploid Aspen Obtained by *in vitro* Technology and Plantation. *Izvestia Sankt-Peterburgskoy lesotekhnicheskoy akademii* [News of the Saint Petersburg State Forest Technical Academy], 2010, iss. 193, pp. 62–71].
16. Топильская Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах // Бюл. науч. информ. Центр. генет. лаб. им. И.В. Мичурина. 1975. № 22. С. 58–61. [Topil'skaya L.A., Luchnikova S.A., Chuvashina N.P. Study of Somatic and Meiotic Chromosomes of Currant on Acetohematoxylin Squashed Preparations. *Byulleten' nauchnoy informatsii Tsentral'noy geneticheskoy laboratorii imeni I.V. Michurina*, 1975, no. 22, pp. 58–61].
17. Уголев В.Н. Древесиноведение и лесное товароведение. М.: Академия, 2011. 272 с. [Ugolev V.N. *Wood Science and Forest Merchandizing*. Moscow, Akademiya Publ., 2011. 272 p.].
18. Царев А.П., Погиба С.П., Лаур Н.В. Селекция лесных и декоративных древесных растений. М.: МГУЛ, 2014. 552 с. [Tsarev A.P., Pogiba S.P., Laur N.V. *Breeding of Forest and Ornamental Woody Plants*. Moscow, MGUL Publ., 2014. 552 p.].
19. Шабунин Д.А., Подольская В.А., Бовичева Н.А. Получение посадочного материала быстрорастущих форм осины с использованием метода *in vitro* и закладка плантаций // Лесохозяйств. информ. 2008. № 3-4. С. 51–53. [Shabunin D.A., Podol'skaya V.A., Bovicheva N.A. Production of Planting Material of Fast-Growing Aspen Forms Using *in vitro* Techniques and Laying out of Plantations. *Lesokhozyaystvennaya informatsiya* [Forestry information], 2008, no. 3-4, pp. 51–53].
20. Ahuja M.R. Somatic Cell Differentiation and Rapid Clonal Propagation of Aspen. *Silvae Genetica*, 1983, vol. 32, iss. 3-4, pp. 131–135.
21. Doyle J.J., Doyle J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, vol. 19, pp. 11–15.
22. Dubova I. Triploidās apses (*P. tremula*) un hibrīdapses (*P. tremuloides* × *P. tremula*) klonu pavairošana audu kultūrā *in vitro* [Micropropagation of Triploid Aspen (*P. tremula*) and Aspen Hybrids (*P. tremuloides* × *P. tremula*) *in vitro*]. *Mežzinātne* [Forest Science], 2008, no. 17(50), pp. 117–130.

23. Greer B.T., Still C., Cullinan G.L., Brooks J.R., Meinzer F.C. Polyploidy Influences Plant-Environment Interactions in Quaking Aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Tree Physiology*, 2018, vol. 38, iss. 4, pp. 630–640. DOI: [10.1093/treephys/tpx120](https://doi.org/10.1093/treephys/tpx120)

24. Hadži-Georgiev K., Goguševski M. Dvolazne tabele mass za topola klona *Populus euramericana* acv. I-214 u gevgeliskom području. *Topola*, 1972, T. XVI, No. 90, pp. 25–29.

25. Khattab S. Effect of Different Media and Growth Regulators on the *in vitro* Shoot Proliferation of Aspen, Hybrid Aspen and White Poplar Male Tree and Molecular Analysis of Variants in Micropropagated Plants. *Life Science Journal*, 2011, vol. 8, iss. 1, pp. 177–184. DOI: [10.7537/marslsj080111.25](https://doi.org/10.7537/marslsj080111.25)

26. Liptáková E. *Chémia a aplikáciapomocnych látok v drevárskom priemysle*. Ed. by E. Liptáková, M. Sedliačik. Bratislava, 1989. 520 p.

27. Lloyd G., McCown B. Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* by Use of Shoot Tip Culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, 1980, vol. 30, pp. 421–427.

28. Luoranen J., Lappi J., Zhang G., Smolander H. Field Performance of Hybrid Aspen Clones Planted in Summer. *Silva Fennica*, 2006, vol. 40, no 2, pp. 257–269. DOI: [10.14214/sf.342](https://doi.org/10.14214/sf.342)

29. Mandal A. Micropropagation of *Populus tremula* L.: Condition for Induction of Shoots and Roots. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 1989, vol. 4, iss. 3–4, pp. 285–293. DOI: [10.1080/02827588909382566](https://doi.org/10.1080/02827588909382566)

30. Mashkina O.S., Butorina A.K., Tabatskaya T.M. Karelian Birch (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) as a Model for Studying Genetic and Epigenetic Variation Related to the Formation of Patterned Wood. *Russian Journal of Genetics*, 2011, vol. 47, iss. 8, pp. 951–957. DOI: [10.1134/S1022795411080126](https://doi.org/10.1134/S1022795411080126)

31. Pirard R., Secco L.D., Warman R. Do Timber Plantations Contribute to Forest Conservation? *Environmental Science & Policy*, 2016, vol. 57, pp. 122–130. DOI: [10.1016/j.envsci.2015.12.010](https://doi.org/10.1016/j.envsci.2015.12.010)

32. Pozdnyakov I., Azarova A., Shestibratov K. Effect of the Volume of Production of Planting Material on the Basis of Clonal Micropropagation on the Cost Price of In vitro-Rooted Birch and Aspen Microplants. *International Journal of Environmental & Science Education*, 2016, vol. 11, no. 18, pp. 12031–12048.

33. Rahman M.H., Dayanandan S., Rajora O.P. Microsatellite DNA Markers in *Populus tremuloides*. *Genome*, 2000, vol. 43, no. 2, pp. 293–297. DOI: [10.1139/g99-134](https://doi.org/10.1139/g99-134)

34. Tullus A., Rytter L., Tullus T., Weih M., Tullus H. Short-Rotation Forestry with Hybrid Aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) in Northern Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2012, vol. 27, iss. 1, pp. 10–29. DOI: [10.1080/02827581.2011.628949](https://doi.org/10.1080/02827581.2011.628949)

35. Ulrich K., Ewald D. Breeding Triploid Aspen and Poplar Clones for Biomass Production. *Silvae Genetica*, 2014, vol. 63, iss. 1-6, pp. 47–58. DOI: [10.1515/sg-2014-0008](https://doi.org/10.1515/sg-2014-0008)

36. Zeps M., Adamovics A., Smilga J., Sisenis L. Productivity and Quality of Hybrid Aspen at the Age of 18 Years. *Proceedings of the Annual 22nd International Scientific Conference "Research for Rural Development 2016"*. Jelgava, Latvia, 2016, vol. 2, pp. 55–61.

37. Zeps M., Auzenbaha D., Gailis A., Treimanis A., Grinfelds U. Hibrīdapšu (*Populus tremuloides* × *Populus tremula*) klonu salīdzināšana un atlase [Evaluation and Selection of Hybrid Aspen (*Populus tremuloides* × *Populus tremula*) Clones]. *Mežzinātne* [Forest Science], 2008, no. 18(51), pp. 19–34.

38. Zontikov D., Zontikova S., Sergeev R., Shurgin A., Sirotina M. Micropropagation of Highly Productive Forms of Diploid and Triploid Aspen. *Advanced Materials Research*, 2014, vol. 962-965, pp. 681–690. DOI: [10.4028/www.scientific.net/AMR.962-965.681](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.962-965.681)

**FIELD TRIALS OF *IN VITRO* PROPAGATED ASPEN CLONES
(*Populus tremula* L.): GROWTH, PRODUCTIVITY, WOOD QUALITY,
AND GENETIC STABILITY**

O.S. Mashkina^{1,2}, Candidate of Biology, Assoc. Prof.; ResearcherID: [H-7362-2014](#),
ORCID: [0000-0001-8252-2192](#)

E.A. Shabanova¹, Research Scientist; ORCID: [0000-0003-3795-2702](#)

I.N. Varivodina¹, Candidate of Engineering, Assoc. Prof.; ResearcherID: [H-9040-2017](#),
ORCID: [0000-0002-0351-8898](#)

T.A. Grodetskaia^{1,2}, Junior Research Scientist, Postgraduate Student;
ResearcherID: [S-8770-2019](#), ORCID: [0000-0002-5448-2792](#)

¹All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, ul. Lomonosova, 105, Voronezh, 394087, Russian Federation; e-mail: mashkinaos@mail.ru, katy-green2009@yandex.ru, varivodinna@rambler.ru, tatyana.pokusina@yandex.ru

²Voronezh State University, Universitetskaya ploshchad', 1, Voronezh, 394018, Russian Federation; e-mail: mashkinaos@mail.ru, tatyana.pokusina@yandex.ru

The widespread introduction of highly productive and rot-resistant forms and hybrids of aspen (*Populus tremula* L.) into the forest production is constrained by the lack of effective methods of their vegetative reproduction. Achievements of modern forest biotechnology enable *in vitro* cloning of economically valuable aspen genotypes and obtain planting material for plantation forest growing. The study of the manifestation features of valuable traits and genetic stability of *in vitro* clones propagated in the field (*ex vitro*) is important for the development of effective and reliable propagation methods that guarantee the preservation of the genetic and economic value of parent trees for their sustainable and targeted reproduction. The results of genetic stability evaluation, growth dynamics, productivity and wood quality of three *in vitro* propagated aspen clones (6/3, 15/01, and 20/4) in the field are presented. Micropropagation was carried out by direct organogenesis using hormone-free nutrient media. According to the results of 17-year field trials, clones demonstrate good growth and sufficiently high productivity of stands; preserve the growth characteristics of parent trees, showing no signs of somaclonal variability. At the age of 17, the average height of the trees was 18–20 m; the trunk diameter was 25–30 cm; the trunk volume was 0.391–0.553 m³; the timber volume was 111–227 m³/ha at trees placing 4×4 and survival rate 44–71 %. High genetic stability of clones *in vitro* and *ex vitro* was revealed based on the results of analysis of microsatellite loci, ploidy level and mixoploidy. It is shown that the triploid clone 15/01, which has high mixoploidy level, is characterized by a higher preservation and better wood quality attributes (wood density and fiber length) than diploid clones. This is probably due to the optimal balanced ratio of cells with different ploidy levels (triploid, diploid, and aneuploid), which provides the most effective expression of genes in specific environmental conditions.

For citation: Mashkina O.S., Shabanova E.A., Varivodina I.N., Grodetskaia T.A. Field Trials of *in vitro* Propagated Aspen Clones (*Populus tremula* L.): Growth, Productivity, Wood Quality, and Genetic Stability. *Lesnoy Zhurnal* [Russian Forestry Journal], 2019, no. 6, pp. 25–38. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2019.6.25

Keywords: *Populus tremula* L., *in vitro* cloning, field trials, chromosomal and microsatellite analysis.

Поступила 28.03.19 / Received on March 28, 2019