

Научная статья

УДК 630*161.443.6:57.085

DOI: 10.37482/0536-1036-2025-3-78-92

Адаптация к условиям почвы отселектированных на устойчивость к засолению *in vitro* регенерантных линий березы

О.С. Машкина^{1,2}, канд. биол. наук, доц.; ResearcherID: [H-7362-2014](https://orcid.org/0000-0001-8252-2192),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8252-2192>

Т.М. Табацкая¹, ст. науч. сотр.; ResearcherID: [ABB-2914-2021](https://orcid.org/0000-0003-1104-4255),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1104-4255>

¹Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, ул. Ломоносова, д. 105, г. Воронеж, Россия, 394087; mashkinaos@mail.ru[✉], tatyana.tabacky@gmail.com

²Воронежский государственный университет, Университетская пл., д. 1, г. Воронеж, Россия, 394018; mashkinaos@mail.ru[✉]

Поступила в редакцию 25.11.23 / Одобрена после рецензирования 08.02.24 / Принята к печати 11.02.24

Аннотация. Тканевая и клеточная селекция растений в культуре *in vitro* является перспективным направлением, дополняет и ускоряет традиционную селекцию. Моделирование стресса в строго контролируемых условиях на селективных средах позволяет проводить отбор по устойчивости к негативным факторам среды (в т. ч. к засухе и засолению), сохранять и клонировать *in vitro* варианты с искомыми признаками. Для лесных древесных растений вопросы, касающиеся адаптации толерантных генотипов к условиям *ex vitro*, изучены недостаточно. В рамках данного исследования рассмотрены особенности адаптации к нестерильным условиям почвы 3 линий березы: пушистой, карельской и далекарлийской – отселектированных в культуре *in vitro* на устойчивость к засолению (NaCl и Cd(NO₃)₂). Оценивали приживаемость, рост и развитие растений в зависимости от возраста, состава субстрата и схемы адаптации. Выявлено, что для успешной приживаемости регенерантов березы в условиях почвы их подготовка к этому этапу должна начинаться на стадии микроразмножения. Показана целесообразность использования питательной среды ½ MS без гормонов для получения регенерантов с активным спонтанным ризогенезом, нормальным ростом и развитием, без признаков соматической изменчивости, сбалансированных по размеру побегов и корневой системы. Наиболее высокая приживаемость *ex vitro* (в среднем 97–99 %) получена при 2-этапной схеме адаптации растений: 14 суток в условиях лаборатории, затем 14 суток в теплице (по сравнению с 1-этапной адаптацией – 28 суток в лаборатории) с последующей высадкой в мае в защищенный грунт теплицы. Показана предпочтительная высадка 1-месячных регенерантов высотой 4,5–6,0 см в контейнеры с субстратом из торфогрунта в сочетании с перлитом в соотношении 3:1. У всех 3 линий установлено активное боковое ветвление корней – в среднем 6–7 корней 1-го порядка и 18–29 корней 2-го порядка. По-видимому, более низкая кратковременная ночная температура в теплице в весенний период по сравнению с дневной стимулирует формирование развитой разветвленной корневой системы. Это обеспечивает лучшее снабжение растений водой и элементами питания, способствуя полной реализации их адаптивного потенциала. После 1–2 лет доращивания в теплице устойчивые к засолению саженцы соответствовали размерам стандартного поса-

дочного материала, который может быть использован для целей защитного лесоразведения и создания испытательных культур.

Ключевые слова: береза, толерантные линии, микроразмножение, субстрат, адаптация, рост, корнеобразование, *in vitro*, *ex vitro*

Благодарности: Исследование выполнено в рамках госзаданий № AAA-A-A20-120012890092-6 и № 123040400004-8 Федерального агентства лесного хозяйства. При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ВНИИЛГИСБиотех «Коллекция *in vitro* клонов ценных генотипов лиственных древесных растений».

Для цитирования: Машкина О.С., Табачкая Т.М. Адаптация к условиям почвы отселектированных на устойчивость к засолению *in vitro* регенерантных линий березы // Изв. вузов. Лесн. журн. 2025. № 3. С. 78–92. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2025-3-78-92>

Original article

Adaptation to Soil Conditions of *in vitro* Regenerated Birch Lines Selected for Salinity Resistance

Olga S. Mashkina^{1,2}✉, Candidate of Biology, Assoc. Prof.; ResearcherID: [H-7362-2014](https://orcid.org/0000-0001-8252-2192), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8252-2192>

Tat'yana M. Tabatskaya¹, Senior Research Scientist; ResearcherID: [ABB-2914-2021](https://orcid.org/0000-0003-1104-4255), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1104-4255>

¹All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, ul. Lomonosova, 105, Voronezh, 304087, Russian Federation; mashkinaos@mail.ru[✉], tatyana.tabacky@gmail.com

²Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394018, Russian Federation; mashkinaos@mail.ru[✉]

Received on November 25, 2023 / Approved after reviewing on February 8, 2024 / Accepted on February 11, 2024

Abstract. Tissue and cellular plant *in vitro* breeding is a promising trend that complements and accelerates traditional breeding. Stress modelling under strictly controlled conditions on selective media allows for selection based on resistance to negative environmental factors (including drought and salinity), and preserving and cloning *in vitro* of selected variants with the desired traits. For forest woody plants, issues related to the adaptation of tolerant genotypes to *ex vitro* conditions have not been sufficiently studied. This research examines the adaptation features to non-sterile soil conditions of 3 birch lines: downy birch, Karelian birch and Ornäs birch selected through *in vitro* culture for resistance to salinity (NaCl and Cd(NO₃)₂). The survival rate, growth and development of plants have been evaluated depending on age, substrate composition and adaptation patterns. It has been revealed that for birch regenerants to successfully survive in soil conditions, their preparation for this stage should begin at the stage of micropropagation. The expediency of using ½ MS nutrient medium without hormones to obtain regenerants with active spontaneous rhizogenesis, normal growth and development, without signs of somaclonal variability, balanced in size shoots and root system has been shown. The highest *ex vitro* survival rate (on average 97–99 %) has been obtained with a 2-stage plant adaptation scheme for plants: 14 days in laboratory conditions, then 14 days in a greenhouse (compared to 1-stage adaptation – 28 days in the laboratory), followed by planting in May in protected soil of a greenhouse. The preferred planting of 1-month-old

regenerants 4.5–6 cm high in containers with a substrate of peat soil combined with perlite in a ratio of 3:1 has been shown. All 3 lines have shown active lateral root branching, with an average of 6–7 roots 1st-order roots and 18–29 2nd-order roots. Apparently, a lower short-term nighttime temperature in the greenhouse in spring compared to the daytime one stimulates the formation of a developed branched root system. This ensures a better supply of water and nutrients to plants, contributing to the full realization of their adaptive potential. After 1 to 2 years of further growing in a greenhouse, salinity-resistant seedlings have corresponded to the sizes of standard planting material, which can be used for protective afforestation and the creation of test crops.

Keywords: birch, tolerant lines, micropropagation, substrate, adaptation, growth, root formation, *in vitro*, *ex vitro*

Acknowledgements: The research was carried out within the framework of the state assignments no. AAA-A-A20-120012890092-6 and no. 123040400004-8 of the Federal Forestry Agency. In preparing the publication, materials from the All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology bioresource scientific collection “Collection of *in vitro* Clones of Valuable Genotypes of Deciduous Woody Plants” were used.

For citation: Mashkina O.S., Tabatskaya T.M. Adaptation to Soil Conditions of *in vitro* Regenerated Birch Lines Selected for Salinity Resistance. *Lesnoy Zhurnal* = Russian Forestry Journal, 2025, no. 3, pp. 78–92. (In Russ.). <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2025-3-78-92>

Введение

В условиях меняющегося климата, участвовавших засух, увеличения масштабов засоления почв, техногенного загрязнения возрастает значимость адаптивной селекции, отбора и создания продуктивных и в то же время стрессоустойчивых форм древесных растений. Береза является одной из лесообразующих и хозяйственно ценных пород России, входит в число главных пород для защитного лесоразведения, эффективность которого определяется наличием толерантных, в т. ч. к засухе и засолению, форм [12, 22].

Тканевая и клеточная селекция растений *in vitro* является перспективным направлением, дополняя и ускоряя традиционный селекционный процесс [5, 19, 20, 24, 26]. Применение биотехнологического подхода дает возможность не только отбирать варианты (отдельные клетки, ткани, целые растения) с искомыми признаками, но и сохранить их и клонировать *in vitro* в короткие сроки. Однако для лесных древесных растений исследования в данном направлении немногочисленны [2, 17, 19], а ряд вопросов недостаточно хорошо изучен, в частности, не определены оптимальные схемы подготовки и адаптации толерантных генотипов к условиям *ex vitro*. Содержащиеся в литературе сведения касаются в основном акклиматизации к нестерильным условиям клонированного *in vitro* селекционного посадочного материала древесных растений, отобранных в природе или полученных методами традиционной селекции [1, 18], а не материала, подвергнутого многократным стрессам, в результате которых у растений нередко происходят морфологические, генетические, физиолого-биохимические и другие изменения [21].

Адаптация и перевод микрорастений из стерильных (*in vitro*) в нестерильные (*ex vitro*) условия является одним из уязвимых и критических этапов клонального микроразмножения, на котором может погибнуть значительная часть культур [4]. Это заключительный и одновременно один из наиболее

стрессовых этапов клонирования *in vitro*, который в целом определяет успех микроразмножения многолетних растений [8]. Известно, что в условиях *in vitro* растения формируют специфический «культуральный фенотип», отличный от обычных растений и носящий приспособительный характер [3]. Чаще всего растения культивируют на плотной агаризованной питательной среде, которая имеет низкую насыщенность кислородом и ведет к гипоксии и обезвоживанию корней. В культуральных сосудах повышена относительная влажность воздуха, отмечается дефицит углекислого газа, в результате у растений появляются нефункционирующие устьица, корневая система часто недоразвита и лишена бокового ветвления, нарушается водный баланс, изменяются процессы транспирации и дыхания, фотосинтетической активности. Недоразвитие (или отсутствие) эпикутикулярного воскового слоя приводит к избыточной транспирации и затрудняет процесс акклиматизации *ex vitro* [25]. Из-за присутствия сахарозы в среде и низкой концентрации CO_2 растения переходят на гетеротрофный тип питания.

Нарушение физиологических процессов в культуре *in vitro*, слабая водоудерживающая способность и чрезмерное испарение листьями в сочетании с недостаточным поглощением корнями воды из почвы часто обуславливают быстрое обезвоживание растений и их гибель [3]. Согласно данным М.А. Кодун-Ивановой [6], в 1-й месяц адаптации микрорастения испытывают наибольший водный стресс, когда наблюдаются максимальные интенсивность транспирации, скорость влагопотери и водный дефицит.

Поэтому необходимо учитывать все факторы, как внутренние, так и внешние, влияющие на адаптацию растений-регенерантов березы *ex vitro*: возраст, размеры и состояние растений перед высадкой в почву, субстраты для адаптации клонов, их генотипические особенности и др. Отмечается, что для успешного приспособления растений-регенерантов к условиям *ex vitro* их подготовка должна начинаться *in vitro* [8, 25].

По результатам наших предыдущих многолетних исследований по моделированию солевого стресса (NaCl , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) *in vitro* у разных видов и гибридов березы были отселектированы наиболее устойчивые линии [22].

Цель настоящей работы – выявление особенностей адаптации к условиям *ex vitro* отселектированных на толерантность к засолению хлоридом натрия и нитратом кадмия регенерантных линий березы.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследования служили 3 ранее отселектированные в культуре *in vitro* солеустойчивые линии березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh., 3п/т), березы карельской (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, Ю/т) и березы далекарлийской (*B. pendula* f. *'dalecarlica'* (L.f.) Schneid, R2/т), показавшие комплексную устойчивость к NaCl и Cd , а также их исходные клоны (3п, Ю, R2) из коллекции *in vitro* Всероссийского научно-исследовательского института лесной генетики, селекции и биотехнологии [7].

Исходные коллекционные клоны хранили путем субкультивирования 1 раз в 5–6 месяцев при стандартных условиях (16-часовой фотопериод, температура – 25–26 °С, освещенность – 2,0 клк) на основе пролиферации пазушных меристем. Для хранения и клонального микроразмножения исходных и отселек-

тированных растений применяли модифицированную нами безгормональную питательную среду [11, 15]. В качестве базовой использовали среду Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макросолей ($\frac{1}{2}$ MS) [23] и сниженной (до 10 г/л вместо стандартных 30 г/л) концентрацией сахарозы. На этапе хранения культур в среды добавляли активированный уголь (2 %), а для долгосрочного хранения брали биологические пробирки (21×200 мм), в которые высаживали по 1 микропобегу. Микрочеренкование растений осуществляли в конических колбах, вместимостью 150 мл, по 3–5 микропобов в каждой.

Схема отбора *in vitro* по устойчивости к засолению представлена в нашей публикации [22] и основана на использовании 2 модельных биотест-систем: сначала коллекции клонов березы *in vitro* (культура микропобегов), а затем стеблевых каллусных культур, полученных от наиболее устойчивых к засолению микроклонов. Селекционная работа базировалась на генетическом разнообразии клонов, входящих в состав коллекции, и индуцированной клеточной гетерогенности каллусных культур, а также отборе наиболее устойчивых растений с применением селективных питательных сред, включающих хлорид натрия (0,2–1,0 %). Отобранные толерантные к засолению NaCl линии березы дополнительно испытывали на способность переносить воздействие кадмия в виде азотнокислой соли $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 10^{-4} М.

Микрорастения первоначально клонировали *in vitro* в январе–марте до необходимого количества (не менее 50 растений на линию) и оценивали коэффициент мультипликации (количество микрочеренков от 1 побега), рост побегов в высоту, общую длину корней (суммарную длину всех корней 1 растения) и их количество в сравнении с исходными клонами. Это позволяет определить эффективность использования отобранных линий для массового размножения, проверить качество посадочного материала *in vitro*.

Выращивание отселектированных линий березы в условиях *ex vitro* проводили в 2 этапа: I этап – адаптация растений в пластиковых контейнерах (в условиях лаборатории, теплицы); II этап – доращивание на грядке в теплице.

Одномесячные *in vitro*-растения высаживали в контейнеры, вместимостью 1 л, заполненные субстратом, по 10 растений в каждый. Для минимизации водного стресса перед помещением в почвенный субстрат осуществляли «воздушную закалку» (аэрацию) растений в открытых культуральных сосудах в течение 2–3 суток на среде с добавлением по 1,0 мл дистиллированной нестерильной воды. Для снижения повреждения корни не отмывали от агара.

Оценивали 2 схемы адаптации (апрель–май): А) растения выращивали в условиях лаборатории (в контейнерах) в течение 28 суток с последующей высадкой в закрытый грунт теплицы; Б) контейнерные растения выдерживали 14 суток в условиях лаборатории, затем 14 суток в теплице и высаживали на грядку в теплицу. Испытывали 4 типа субстратов, приготовленных на основе торфа и перлита в соотношении 3:1. Основой субстрата служили готовые торфогрунты российского производства с различным содержанием минеральных добавок: верховой нейтрализованный торф (ООО РТК, Москва); pH – 5,5–6,5; верховой нейтрализованный торф «Премиум» (ООО «Агро Торф ЛТД», Псковская обл.) с содержанием (мг/кг) не менее: азота – 100, фосфора – 9 и калия – 10, pH – 5,5–6,5; торфогрунт универсальный («Экорост», Московская обл.), состоящий из торфа верхового, песка, муки известняковой, с содержанием (мг/кг) не менее: азота – 300, фосфора – 200 и калия – 350; pH – 5,4–6,6; торфо-

грунт «Фаско» (ООО «Фаско», Московская обл.) из торфа верхового и низинного, песка, муки известняковой, с содержанием (мг/кг) не менее: азота – 350, фосфора – 400 и калия – 500, pH – 6–7.

Повышенную влажность (80–90 %) обеспечивали укрытием пересаженных в субстрат растений другим прозрачным контейнером того же объема. Через 7–10 суток укрытие снимали, снижая влажность воздуха до значений окружающей среды и выдерживали при освещенности 1,0–1,5 клк, 16-часовом фотопериоде, температуре 18–23 °С. Через 28 суток адаптации все растения высотой 8–10 см с хорошо развитой корневой системой пикировали в середине мая в грунт теплицы летнего типа, покрытой поликарбонатом (освещение естественное, без туманообразующей установки), для их доращивания. Состав грунта: торф, почва, песок в соотношении 1:1:1. Размещение растений – 100 шт. на 1 м² с междурядьем 10 см, между растениями в ряду – 10 см.

Реакцию растений на условия *ex vitro* определяли на всех этапах адаптации после высадки в почву. Учитывали приживаемость (доля прижившихся растений по отношению к числу высаженных), рост и развитие побегов и корневой системы при разных схемах адаптации, использованных субстратах. Все эксперименты проводили в 2-кратной повторности, каждая из которых (регенерантная линия, исходный клон) включала по 20 растений.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Stadia 7.0 Professional (InCo, Россия). Для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Микрочеренкование отселектированных линий (подготовительный этап in vitro). Клонированные *in vitro* образцы линий березы формировали нормальный морфотип, характеризовались активным спонтанным ризогенезом (до 100 % укорененных растений) и хорошим ростом (табл. 1, см. рисунок).

Таблица 1

Морфометрические показатели 2-месячных растений березы после микрочеренкования на безгормональной питательной среде ½ MS The morphometric parameters of 2-month-old birch plants after micrografting on a ½ MS hormone-free nutrient medium

Клон, линия	Высота побегов (h), см	Общая длина корней, см	Количество корней, шт.	h/l	Коэффициент мультипликации
<i>Исходные клоны</i>					
Зп	9,0 ± 0,13	9,8 ± 0,04	3,6 ± 0,33	0,92	7,6 ± 0,11
Ю	8,4 ± 0,17	10,8 ± 0,21	3,3 ± 0,33	0,82	6,6 ± 0,07
R2	8,8 ± 0,21	12,0 ± 0,22	4,3 ± 0,13	0,73	6,3 ± 0,09
<i>Среднее</i>	8,8 ± 0,14	10,9 ± 0,17	3,8 ± 0,17	0,82 ± 0,21	6,8 ± 0,15
<i>Регенерантные линии</i>					
Зп/т	9,5 ± 0,10*	13,2 ± 0,17	8,3 ± 0,13	0,72	7,3 ± 0,26
Ю/т	8,9 ± 0,21	11,4 ± 0,11	7,3 ± 0,33	0,78	6,1 ± 0,22
R2/т	9,1 ± 0,10	10,6 ± 0,08	6,7 ± 0,25	0,86	6,5 ± 0,19
<i>Среднее</i>	9,2 ± 0,18*	11,7 ± 0,18**	7,4 ± 0,17**	0,79 ± 0,01	6,6 ± 0,13

Примечание: Представлены усредненные данные 3 циклов черенкования. *Различия с исходными клонами (контролем) статистически значимы при P < 0,05; ** – при P < 0,001.



а

б



в



з



д



е



ж

Этапы адаптации к условиям *ex vitro* растений-регенерантов, устойчивых к засолению (NaCl , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$): а – опытная партия солеустойчивых клонов березы *in vitro*; б – укорененное микрорастение; в, з – адаптация в условиях лаборатории; д – адаптация в теплице; е, ж – посадочный материал 1-го года вегетации

The stages of adaptation to *ex vitro* conditions of regenerated salinity-resistant (NaCl , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) plants: а – pilot batch of salt-resistant *in vitro* birch clones; б – rooted microplant; в, з – adaptation under laboratory conditions; д – adaptation in a greenhouse; е, ж – planting material of the 1st year of vegetation

Образцы также демонстрировали высокую сохранность (в среднем 92,7 % через 2 месяца культивирования с варьированием от 89,3 до 99,3 % у разных линий) и регенерационную активность (коэффициент мультипликации составил 6,1–7,3), что сопоставимо с показателями исходных клонов (сохранность – 85–92 %, коэффициент мультипликации – 6,3–7,6).

Не отмечено дисбаланса между линейными размерами надземной части побега и его корневой системой. Соотношение высоты побегов и общей (суммарной) длины корней отселектированных линий и их исходных клонов составили соответственно 0,82 и 0,79. В обоих случаях *in vitro* формировались корни 1-го порядка, отходящие непосредственно от базальной части микро-

побега. При этом среднее количество корней у линий было в 2 раза выше, чем у исходных клонов (7–8 и 3–4 шт. соответственно). Такая многочисленность (мочковатость) корней увеличивает их всасывающую поверхность, что может обеспечить лучшее поглощение воды и питательных веществ после высадки растений в почвенный субстрат. Есть данные, что низкое соотношение длины «побег:корень», т. е. между транспирирующей и поглощающей поверхностями у сеянцев способствует последующему более быстрому росту корней и лучшей выживаемости растений при их пересадке в условия водного дефицита [14].

Таким образом, на питательной среде без гормонов микропобеги березы имели хороший рост, нормальное развитие, высокую ризогенную активность, увеличенное (по сравнению с исходными клонами) количество корней 1-го порядка. Следует отметить, что исследователи для укоренения микропобегов используют питательные среды с гормонами ауксиновой природы [10, 18]. В работе В.И. Деменко и др. [4] отмечается, что процесс ризогенеза, морфология и структура корней в этом случае зависят от типа и концентрации ауксина, а укорененные без его применения побеги лучше приживались *ex vitro*. В экспериментах с триплоидной осиною наблюдалась значительная диспропорция у растений-регенерантов (надземная часть в 2 раза преобладала над корневой системой), укорененных на питательной среде с индолилмасляной кислотой (0,5–1,0 мг/л) [10]. Для повышения приживаемости таких растений авторы рекомендуют перед высадкой в почву проводить декапитацию верхушечного побега с оставлением 2 междоузлий, что может стимулировать развитие пазушных побегов и привести к многостволости. Это потребует дополнительного этапа по формированию саженца с 1 стволом, что усложняет и удорожает выращивание посадочного материала.

Для сравнения, наши предыдущие исследования показали, что спонтанное укоренение микропобегов на питательных средах без гормонов приводило к формированию пропорционально развитых регенерантов березы, тополя и осины, пригодных для высадки в почву. Причем растения хорошо приживались в почве (70–100 % в зависимости от генотипа) при их «прямой» высадке, т. е. из культуры *in vitro* сразу в нестерильный грунт теплицы [11]. Ограничивающим фактором использования такого приема являются резкие температурные перепады в начале вегетационного сезона (апрель–май), что оказывает существенное влияние на адаптацию микрорастений в зависимости от срока их высадки в теплицу летнего типа. Так, значительные суточные колебания температуры (от –0,1 до +23,3 °С) в I декаде мая 2023 г. на фоне повышенной влажности в теплице привели в первые 10 дней после высадки к гибели значительной части растений (приживаемость составила в среднем 40 %). В период же выровненного температурного режима (II и III декады июня 2023 г.) приживаемость в теплице была высокой и составила в среднем 88,3 % для регенерантных линий и 85 % для их исходных клонов. По этой причине для успешной адаптации растений к условиям теплицы в более ранние сроки нами была проведена их поэтапная подготовка с предварительной акклиматизацией в лабораторных условиях.

Влияние субстрата на адаптацию размноженных in vitro растений к условиям ex vitro. Все испытанные субстраты на основе верхового торфа были пригодны для выращивания березы (табл. 2). Однако лучший рост и прижи-

ваемость регенерантов получены при использовании торфогрунта «Фаско». Субстрат, состоящий из смеси торфогрунта «Фаско» и перлита (в соотношении 3:1), по-видимому, обеспечивал растения полноценным минеральным питанием, аэрацией (благодаря пористой структуре перлита) и водоснабжением. Это положительно сказывалось на приживаемости и росте растений. Высота 28-дневных саженцев составила 8,4 см при 6,5–6,8 см на остальных субстратах, приживаемость – 99,3 % при 76,7–83,3 % в других вариантах.

Таблица 2

**Влияние субстрата на рост и приживаемость регенерантов березы
в нестерильных условиях (на примере клона регенерантной линии 3п/т)
The effect of the substrate on the growth and survival rate of birch regenerants under
non-sterile conditions (using the example of a clone of the 3 p/t regenerant line)**

Субстрат	Высота саженцев, см	Приживаемость, %
Торф верховой, перлит (3:1)	6,8 ± 0,09	76,7 ± 1,67
Торф верховой «Премиум», перлит (3:1)	6,5 ± 0,11*	83,3 ± 1,26*
Торфогрунт универсальный, перлит (3:1)	6,8 ± 0,13	88,3 ± 0,63**
Торфогрунт «Фаско», перлит (3:1)	8,4 ± 0,11**	99,3 ± 0,25**

Примечание: Указаны данные для 28-дневных регенерантов в условиях лаборатории. *Различия с субстратом из торфа верхового и перлита статистически значимы при $P < 0,01$; ** – при $P < 0,001$.

Возраст регенерантов перед высадкой в почвенный субстрат. Исследования показали, что для высадки в контейнеры пригодны растения-регенеранты березы 2 сроков культивирования *in vitro*, как 1-, так и 2-месячные, различающиеся по росту в высоту: средnekрупные (1-месячные, высотой 4,5–6,0 см) и крупные (2-месячные, высотой 6,5–8,0 см). В обоих случаях растения имели нормальный морфотип, крепкие стволы, отличались внутриклоновой однородностью по росту и высокой (до 100 %) частотой укоренения. Этому, возможно, способствует выращивание микрорастений в индивидуальных сосудах, что устраняет конкурентное негативное влияние на развитие. Тем не менее преимуществом использования 1-месячных растений по сравнению с 2-месячными является возможность сокращения срока культивирования *in vitro*, а также увеличения продолжительности 1-го вегетационного сезона *ex vitro*, что позволяет получать хорошо адаптированный посадочный материал. Технические приемы пикировки 1-месячных растений в субстрат контейнеров удобны и менее трудоемки, чем 2-месячных с более длинными стволиками и корневой системой. Кроме того, чем короче цикл культивирования *in vitro*, предшествующий акклиматизации *ex vitro*, тем, по-видимому, менее выражены особенности, характерные для «культурального *in vitro* фенотипа».

Влияние схемы адаптации на развитие корневой системы регенерантов. Приживаемость микрорастений в нестерильных условиях зависит и от качества корневой системы. Она должна быть хорошо развитой, разветвленной (с боковым ветвлением) и функционирующей, способной к поглощению элементов питания из почвенного субстрата, обеспечивающей последующий рост и развитие растений *ex vitro*. Чем сильнее разветвлен корень, тем больше корневая система имеет зон активного поглощения (расположенных в зоне деления и растяжения клеток кончика корешка, а также в зоне корневых волосков) воды и минеральных элементов [9]. Есть мнение, что дефекты работы корневой системы растений-регенерантов являются одной из основных причин их низкой приживаемо-

сти в почвенном субстрате. Даже 100%-ное укоренение побегов *in vitro* не всегда обеспечивает развитие корневой системы в условиях нестерильной почвы [25].

Результаты эксперимента показали, что независимо от схемы адаптации у регенерантов в почвенном субстрате происходило активное боковое ветвление корней с формированием корней 2-го порядка. Однако среднее количество корней и 1-го, и 2-го порядка было существенно выше при выращивании контейнерных растений в течение 14 суток в условиях лаборатории, затем 14 суток в теплице. Причем все 3 проанализированные линии сходно реагировали на данные условия (табл. 3).

Таблица 3

Среднее (с ошибкой) количество корней (шт.) 1-го и 2-го порядка у линий березы при разных схемах адаптации в условиях *ex vitro*
The average (with error) number of 1st-order and 2nd-order roots in birch lines under different adaptation schemes under *ex vitro* conditions

Линия	А		Б	
	Корни 1-го порядка	Корни 2-го порядка	Корни 1-го порядка	Корни 2-го порядка
Зп/т	4,6 ± 0,06	13,2 ± 0,23	7,3 ± 0,20*	27,8 ± 0,63*
Ю/т	4,7 ± 0,08	10,8 ± 0,06	5,8 ± 0,17*	18,0 ± 0,16*
R2/т	5,1 ± 0,11	10,5 ± 0,12	7,0 ± 0,29*	29,4 ± 0,49*
<i>Среднее</i>	4,6 ± 0,07	11,4 ± 0,19	6,3 ± 0,17*	23,8 ± 0,86*

Примечание: Почвенный субстрат: торфогрунт «Фаско» и перлит (3:1). Указаны данные для 1-месячных контейнерных растений. *Различия варианта со схемой адаптации Б по сравнению с вариантом со схемой адаптации А статистически значимы при $P < 0,001$.

Это может быть связано с тем, что при выращивании весной в теплице летнего типа растения испытывают существенные колебания температуры в суточном цикле (более низкая ночная температура чередуется с оптимальной или близкой к ней дневной) по сравнению с относительно одинаковой (18–23 °С) – в лаборатории. Есть сведения, что снижение ночной температуры на 5–10 °С стимулирует формирование корневой системы и тормозит рост стебля в высоту [9]. По данным А.Ф. Титова и др. [16], ежесуточно повторяющиеся кратковременные низкотемпературные воздействия (дроп-воздействия) могут обеспечить повышенную скорость фотосинтеза, способствуя более полной реализации адаптивного потенциала растений.

Кроме того, развитие и рост корней зависят от соотношения температуры воздуха и почвы в корнеобитаемом слое. Согласно данным И.Н. Рахтеенко [13], наилучшее нарастание активных (всасывающих) корней у сосны и ели наблюдается при температуре почвы 10–12 °С, дуба и липы – при более высокой температуре – 15–17 °С. Оптимальной температурой корнеобитаемого слоя субстрата для поглощения и усвоения ионов, в т. ч. фосфора, необходимого для развития и роста корневой системы, считают 18–23 °С.

Влияние схемы адаптации на приживаемость и рост растений в грунте теплицы. Приживаемость растений в грунте теплицы была существенно выше в варианте Б и составила в среднем 97,0 против 79,2 % в варианте А (табл. 4). Вероятно, более развитая (превосходящее количество корней 1-го и 2-го порядка) корневая система при схеме адаптации по варианту Б обеспечивает лучшее снабжение растений водой и элементами питания, что, в свою очередь, положи-

тельно сказывается на их приспособительных возможностях *ex vitro*, в частности, приживаемости.

Таблица 4

Приживаемость и высота регенерантов березы в грунте теплицы в зависимости от схемы их адаптации в контейнерах
The survival rate and height of birch regenerats in the greenhouse soil, depending on the scheme of their adaptation in containers

Линия	А		Б	
	Высота, см	Приживаемость, %	Высота, см	Приживаемость, %
Зп/т	25,9 ± 0,20	83,3 ± 1,67	36,2 ± 0,04*	99,9 ± 0,03*
Ю/т	31,1 ± 0,24	75,0 ± 2,50	31,7 ± 0,10	99,9 ± 0,05*
R2/т	25,9 ± 0,49	80,0 ± 1,44	27,1 ± 0,40	95,0 ± 1,44*
<i>Среднее</i>	27,6 ± 0,41	79,2 ± 0,96	31,7 ± 0,57*	97,0 ± 0,72*

Примечание: Учет приживаемости 1-месячных контейнерных растений проводили через 1 месяц после их высадки в грунт теплицы, высоты – в конце 1-го года вегетации (сентябрь). *Различия варианта со схемой адаптации Б по сравнению с вариантом со схемой адаптации А статистически значимы при $P < 0,001$.

Не отмечено существенных различий по росту в высоту растений отдельных линий в зависимости от схемы адаптации, за исключением линии Зп/т, где превышение по данному признаку составило 1,4 раза в варианте Б. Очевидно, приживаемость саженцев березы в большей степени по сравнению с ростом в высоту определена последовательностью этапов их адаптации *ex vitro*. В конце 1-го года вегетации (конец сентября) в условиях защищенного грунта теплицы высота растений (вариант Б) в среднем составила 31,7 см, средний коэффициент вариации – 12,2 %, а после 2 лет доращивания – соответственно 53–69 см и 30,6 %, что сопоставимо с размерами их исходных клонов (табл. 5). Причем диаметр стволика у корневой шейки у линий Зп/т и Ю/т был достоверно выше по сравнению с их исходными клонами.

Таблица 5

Показатели роста 2-летних саженцев регенерантных линий березы и их исходных клонов в условиях защищенного грунта теплицы, 2023 г.
The growth performance of 2-year-old seedlings of regenerated birch lines and their original clones in the protected greenhouse soil, 2023

Клон, линия	Высота растений		Диаметр у корневой шейки	
	см	св, %	мм	св, %
<i>Исходные клоны</i>				
Зп	76,9 ± 4,29	26,2	4,5 ± 0,10	10,8
Ю	50,8 ± 3,76	36,2	3,6 ± 0,13	18,3
R2	77,5 ± 3,48	21,1	4,0 ± 0,12	14,7
<i>Среднее</i>	67,9 ± 2,68	32,5	4,0 ± 0,10	16,9
<i>Регенерантные линии</i>				
Зп/т	69,0 ± 3,88	26,4	5,4 ± 0,14**	12,3
Ю/т	66,4 ± 4,08*	29,5	5,2 ± 0,23**	21,6
R2/т	52,6 ± 3,22**	29,9	3,9 ± 0,17	21,4
<i>Среднее</i>	62,4 ± 2,29	30,6	4,8 ± 0,13**	23,3

*Различия регенерантных линий с исходными клонами статистически значимы при $P < 0,01$, ** – при $P < 0,001$.

В соответствии с ОСТ 56-98-93 (Отраслевой стандарт. Сеянцы и саженцы основных древесных и кустарниковых пород. Технические условия. Утв. и введен в действие приказом Рослесхоза от 10.12.1993 № 327), высота 1–2-летних берез повислой, карельской и пушистой в лесостепной зоне должна быть не менее 20–25 см, диаметр стволика у корневой шейки – не менее 2–3 мм. Следует отметить, что в документе приведены значения, рекомендуемые для сеянцев и саженцев, полученных традиционным способом (не в культуре *in vitro*). Таким образом, растения толерантных линий исследованных видов берез, полученные по технологии *in vitro*, соответствовали размерам стандартного посадочного материала, имели здоровую и хорошо развитую корневую систему, прямые, неповрежденные стволики и поэтому пригодны для создания испытательных культур и использования для целей защитного лесоразведения.

Заключение

Приживаемость, рост и развитие побегов и корневой системы толерантных к засолению (NaCl , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) линий березы (прошедших многократный солевой стресс в культуре *in vitro*) в 1-й месяц адаптации в нестерильных условиях зависят от возраста регенерантов перед высадкой в грунт, субстрата и схемы адаптации. Для успешного приспособления растений к условиям *ex vitro* их подготовка должна начинаться уже на этапе микроразмножения. Показано, что клонирование *in vitro* растений следует проводить на безгормональной питательной среде со сниженным содержанием макросолей ($\frac{1}{2}$ MS) и сахарозы (10 г/л). Это позволит получить полноценно развитые и сбалансированные по размеру побега и корневой системы растения-регенеранты, без признаков соматональной изменчивости, с сохранением у отобранных линий индивидуальных ростовых особенностей исходных клонов. Установлено, что оптимальными регламентами адаптации регенерантов березы к условиям закрытого грунта являются: 1) высадка в нестерильный субстрат 1-месячных (а не 2-месячных) растений высотой 4,5–6,0 см; 2) использование субстрата в контейнере, состоящего из смеси торфогрунта «Фаско» (включающего различные типы торфа и песок, обогащенного азотом, фосфором и калием) и перлита (3:1); 3) 2-этапная схема адаптации контейнерных растений общей длительностью выращивания 28 суток (14 суток в условиях лаборатории, затем 14 суток в теплице) с последующей их высадкой в середине мая в защищенный грунт теплицы. Выполнение перечисленных условий позволит обеспечить приживаемость растений в субстрате и грунте теплицы (до 97–99 %), их хороший рост, полноценное развитие побегов и функционирующей разветвленной корневой системы, т. е. будет способствовать реализации адаптивного потенциала толерантных к засолению линий. Полученные данные дают возможность усовершенствовать методические регламенты подготовки и адаптации устойчивых линий разных видов и разновидностей березы к условиям *ex vitro*, вырастить качественный, стандартный по размерам посадочный материал для создания испытательных культур и использования для целей защитного лесоразведения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бовичева Н.А., Шабунин Д.А., Жигунов А.В., Подольская В.А. Выращивание саженцев триплоидной осины из регенерантов, полученных по технологии *in vitro* // Тр. СПбНИИЛХ. 2006. Вып. 3(16). С. 68–76.

Bovicheva N.A., Shabunin D.A., Zhigunov A.V., Podolskaya V.A. Growing of triploid aspen seedlings from regenerants obtained through *in vitro* technology. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva* = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute, 2006, iss. 3(16), pp. 68–76. (In Russ.).

2. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф. Влияние кадмия на геммо- и ризогенез карельской березы // Физиология растений. 2022. Т. 69, № 4. С. 408–416.

Vetchinnikova L.V., Titov A.F. Effect of Cadmium on Gemmation and Rhizogenesis in Karelian Birch. *Fiziologiya rastenij* = Russian Journal of Plant Physiology, 2022, vol. 69, art. no. 72. <https://doi.org/10.1134/S1021443722040197>

3. Гигалошвили Т.С., Родькин О.И., Реуцкий В.Г. Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. М.: ИФР РАН, 1997. С. 413.

Gigaloshvili T.S., Rod'kin O.I., Reutskij V.G. Microcloning Conditions Form a Specific Cultural Phenotype. *In vitro Plant Cell Biology, Biotechnology and Gene Pool Conservation*. Moscow, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS Publ., 1997, p. 413. (In Russ.).

4. Деменко В.И., Лебедев В.Г. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Изв. ТСХА. 2011. Вып. 1. С. 60–70.

Demenko V.I., Lebedev V.G. Adaptation of *in vitro* Plants to Non-Sterile Conditions. *Izvestiya Timiryazevskoj sel'skokhozyajstvennoj akademii* = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy, 2011, iss. 1, pp. 60–70. (In Russ.).

5. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Изв. вузов. Лесн. журн. 2013. № 2. С. 27–35.

Zhigunov A.V. Use of Biotechnology in the Russian Forest Sector. *Lesnoj Zhurnal* = Russian Forestry Journal, 2013, no. 2, pp. 27–35. (In Russ.).

6. Кодун-Иванова М.А. Показатели водного стресса микроклонально размноженных растений осины *Populus tremula* при их выращивании в условиях *ex vitro* // Тр. БГТУ. 2017. Сер. 1, № 2. С. 146–155.

Kodun-Ivanova M.A. Indicators of Water-Stress of Microclonal Aspen *Populus tremula* to the *ex vitro* Conditions. *Trudy BGTU* = Proceedings of BSTU, 2017, ser. 1, no. 2, pp. 146–155. (In Russ.).

7. Коллекция *in vitro* клонов ценных генотипов лиственных древесных растений. Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации. Режим доступа: <https://ckp-rf.ru/catalog/usu/569228/> (дата обращения: 03.03.24).

Collection of *in vitro* Clones of Valuable Genotypes of Deciduous Woody Plants. *Scientific and Technological Infrastructure of the Russian Federation*. (In Russ.).

8. Красинская Т.А., Кухарчик Н.В., Кастрюцкая М.С. Адаптационный процесс растений-регенерантов, выращенных в культуре *in vitro*, в условиях *ex vitro* и способы его улучшения // Плодоводство. 2010. Т. 22. С. 309–320.

Krasinskaya T.A., Kukharchik N.V., Kastritskaya M.S. Adaptation Process of Plant Regenerants after *in vitro* in *ex vitro* Conditions and Ways to Improve it. *Plodovodstvo*, 2010, vol. 22, pp. 309–320. (In Russ.).

9. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: в 2 т. Т. 2. М.: Юрайт, 2023. 459 с.

Kuznetsov V.V., Dmitrieva G.A. *Plant Physiology*: In 2 vols. vol. 2. Moscow, Yurajt Publ., 2023. 459 p. (In Russ.).

10. Макаров С.С., Антонов А.М., Александрова Ю.В., Лебедева О.П., Кузнецова И.Б. Адаптация триплоидной осины к условиям *ex vitro* с применением гидропонной установки // Сиб. лесн. журн. 2023. № 3. С. 27–33.

Makarov S.S., Antonov A.M., Alexandrova Yu.V., Lebedeva O.P., Kuznetsova I.B. Adaptation of Triploid Aspen to *ex vitro* Conditions Using a Hydroponic System. *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* = Siberian Journal of Forest Science, 2023, no. 3, pp. 27–33. (In Russ.).

<https://doi.org/10.15372/SJFS20230304>

11. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Внукова Н.И. Технология долгосрочного хранения в культуре *in vitro* ценных генотипов березы и выращивание на ее основе посадочного материала // Биотехнология. 2019. Т. 35, № 3. С. 57–67.

Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Vnukova N.I. Long-term *in vitro* Storage Technique of Valuable Birch Genotypes and Plant Production on its Basis. *Biotechnologiya* = Russian Journal of Biotechnology, 2019, vol. 35, no. 3, pp. 57–67. (In Russ.).

<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-57-67>

12. Михин В.И., Михина Е.А. Особенности формирования защитных насаждений из березы повислой с Центральной лесостепи России // Лесотехн. журн. 2019. № 4. С. 41–49.

Mikhin V.I., Mikhina E.A. Features of Formation of Protective Plantings from a Birch Hanging in the Central Forest-Steppe of Russia. *Lesotekhnicheskij zhurnal* = Forestry Engineering Journal, 2019, no. 4, pp. 41–49. (In Russ.).

<https://doi.org/10.34220/issn.2222-7962/2019.4/5>

13. Рахтеенко И.Н. Рост и взаимодействие корневых систем древесных растений. Минск: АН БССР, 1963. 254 с.

Rakhtenko I.N. *Growth and Interaction of Root Systems of Woody Plants*. Minsk, Academy of Sciences of the Belarusian Soviet Socialist Republic Publ., 1963. 254 p. (In Russ.).

14. Робонен Е.В., Чернобровкина Н.П., Егорова А.В., Зайцева М.И., Нелаева К.Г. Морфометрические критерии оценки качества контейнерных сеянцев хвойных пород // Изв. вузов. Лесн. журн. 2023. № 5. С. 42–57.

Robonen E.V., Chernobrovkina N.P., Egorova A.V., Zaitseva M.I., Nelaeva K.G. Morphometric Criteria for Assessing the Containerized Conifers Seedlings Quality. *Lesnoy Zhurnal* = Russian Forestry Journal, 2023, no. 5, pp. 42–57. (In Russ.).

<https://doi.org/10.37482/0536-1036-2023-5-42-57>

15. Табацкая Т.М., Машкина О.С. Опыт длительного хранения коллекции ценных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред // Лесоведение. 2020. № 2. С. 147–161.

Tabatskaya T.M., Mashkina O.S. An Experiment of a Long-Term Preservation of a Valuable Birch Genotypes Collection Using Non-Hormone Nutrient Media. *Lesovedenie* = Russian Journal of Forest Science, 2020, no. 2, pp. 147–161. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31857/S0024114820020084>

16. Титов А.Ф., Шibaева Т.Г., Икконен Е.Н., Шерудило Е.Г. Реакции растений на кратковременные ежесуточные понижения температуры: феноменология и механизмы // Физиология растений. 2020. Т. 67, № 6. С. 599–615.

Titov A.F., Shibaeva T.G., Ikkonen E.N., Sherudilo E.G. Plant Responses to a Daily Short-Term Temperature Drop: Phenomenology and Mechanisms. *Fiziologiya rastenij* = Russian Journal of Plant Physiology, 2020, vol. 67, no. 6, pp. 599–615. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31857/S0015330320060184>

17. Худолієва Л.В., Куцоконь Н.К. Порівняння солестійкості представників родин *Populus* і *Salix* в умовах *in vitro* // ScienceRise: Biological Science. 2018. № 2(11). С. 35–38.

Khudolieva L., Kutsokon N. *In vitro* Evaluation of Salt Tolerance of Poplars and Willows. *ScienceRise: Biological Science*, 2018, no. 2(11), pp. 35–38. (In Ukr.).

<https://doi.org/10.15587/2519-8025.2018.129702>

18. Chornobrov O., Melnyk O., Karpuk A., Vasylyshyn R. Peculiarities of Plant Adaptation of Interspecific Hybrid *Betula ex vitro*. *Scientific Horizons*, 2023, vol. 26, no. 11, pp. 49–57. <https://doi.org/10.48077/scihor11.2023.49>

19. Fernández R., Bertrand A., Casares A., García R., González A., Tamés R.S. Cadmium Accumulation and its Effect on the *in vitro* Growth of Woody Fleabane and Mycorrhized White Birch. *Environmental Pollution*, 2008, vol. 152, iss. 3, pp. 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.011>
20. Jan N., Qazi H.A., Ramzan S., John R. Developing Stress-Tolerant Plants Through *in vitro* Tissue Culture: Family *Brassicaceae*. *Biotechnologies of Crop Improvement*, 2018, vol. 1, pp. 327–372. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6_10
21. Kou J., Yan D., Qin B., Zhou Q., Liu C., Zhang L. Physiological Response Mechanism of European Birch (*Betula pendula* Roth) to PEG-induced Drought Stress and Hydration. *Frontiers in Plant Science*, 2023, vol. 14, art. no. 1226456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226456>
22. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Korchagin O.M. *In vitro* Selection of Birch for Tolerance to Salinity Stress. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 875, art. no. 012082. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/875/1/012082>
23. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, iss. 13, pp. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
24. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing Stress Tolerant Plants through *in vitro* Selection – An Overview of the Recent Progress. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, vol. 71, iss. 1, pp. 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021>
25. Rohr R., Iliev L., Scaltsoyiannes A., Tsoulpha P. Acclimatization of Micropropagated Forest Trees. *Acta Horticulturae*, 2003, vol. 616, pp. 59–69. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.3>
26. Terletskaia N., Khailenko N., Zhambakin K. Stability of Cereal Crops to Drought and Saline Stress *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Life Sciences*, 2013, vol. 7, no. 2, pp. 135–144. <https://doi.org/10.17265/1934-7391/2013.02.006>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest