

3. ЛІСОВІ КУЛЬТУРИ, ФІТОМЕЛІОРАЦІЯ, СЕЛЕКЦІЯ І ГЕНЕТИКА



Forestry Academy of Sciences
of Ukraine

Наукові праці Лісівничої академії наук України
Proceedings of the Forestry Academy of Sciences of Ukraine

<http://fasu.nltu.edu.ua>
<https://doi.org/10.15421/411906>
Article received 2018.10.02
Article accepted 2019.03.28

ISSN 1991-606X print
ISSN 2616-5015 online
@ ✉ Correspondence author
Natalia Vysotska
vysotska_n@ukr.net
Pushkinska str., 86, Kharkiv, 61024, Ukraine

УДК 630*165.7 : 58.085 : 674.031.623.23

Особливості мікроклонального розмноження цінних генотипів роду *Populus L. in vitro*

Н. Ю. Висоцька¹, І. В. Золотих²

Досліджено особливості морфогенезу, пагоноутворення та мультиплікації різних генотипів тополі в культурі *in vitro*, які вирізнялись високою господарською цінністю у дослідно-виробничих і сортовипробувальних культурах, а саме, клони тополь української селекції «Новоберлінська», «Дружба», «Гулівер», «Перспективна», «Львівська», «Західна», «Лубенська». Визначено оптимальні склад сольового середовища та концентрації гормонів для успішної ініціації культури *in vitro* та мультиплікації.

Морфогенезна активність усіх досліджених клонів тополь після декількох пасажів була достатньо високою на всіх обраних типах середовищ незалежно від концентрації б-бензиладеніну. Водночас вплив середовища ініціації на успішність пагоноутворення був досить суттєвим. Двофакторним дисперсійним аналізом встановлено, що можливість пагоноутворення на 83,8% зумовлено сольовим складом середовища, на 0,3% – концентрацією гормонів, а 15,9% припадає на дію чинників, що не підлягали обліку, в т.ч. на вплив генотипу.

Найбільшу частку пагоноутворення отримали на середовищі MS (61,7 та 72,3% з додаванням БАП у концентрації 0,1 мг/л та 0,3 мг/л відповідно). Встановлено, що формування адвентивних бруньок на експланті на 69% зумовлено концентрацією гормонів, на 22% – сольовим складом середовища, а 9% припадає на дію інших чинників.

Підтверджено значний вплив генотипу на всі досліджувані характеристики. Найвищу морфогенезну активність відзначено у клонів тополь «Перспективна», «Лубенська», «Дружба» та «Новоберлінська». Проліферація пагонів найінтенсивніше відбувається у клонів: «Дружба» та «Західна». Найкращу здатність до формування адвентивних бруньок виявляли клони «Західна», «Гулівер», «Дружба» і «Новоберлінська».

Універсальним для мікророзмноження тополь української селекції є середовище MS із додаванням б-бензиладеніну у концентрації 0,3 мг/л.

Ключові слова: тополі; генотип; мікророзмноження; поживне середовище; б-бензиладенін; морфогенез; пагоноутворення; адвентивні бруньки; мультиплікація.

¹ Висоцька Наталія Юріївна – член-кореспондент Лісівничої академії наук України, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, перший заступник директора з наукових питань Українського ордена «Знак Пошани» науково-дослідного інституту лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького, вул. Пушкінська, 86, м. Харків, 61024, Україна. Тел.: +38-057-707-80-59. E-mail: vysotska_n@ukr.net, vysotska@urifm.org.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3033-2036>

² Золотих Ірина Віталіївна – науковий співробітник лабораторії селекції Українського ордена «Знак Пошани» науково-дослідного інституту лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького, вул. Пушкінська, 86, м. Харків, 61024, Україна. Тел.: +38-057-707-80-49. E-mail: zolot_irina@yandex.ru

Вступ. Представники роду *Populus L.* є одними із найшвидкоросліших серед деревних порід і вирощуються для різних господарчих потреб (Fuchylo, Maurer, Sbytna, Odarchenko, & Fuchylo, 2016). Більшість з них можуть розмножуватися живцями, але найефективнішим з погляду швидкості та ефективності розмноження є метод мікроклонального розмноження.

Дослідження науковців (Wu Shuang-Xiu & Zu Yuan-Gang, 2006) свідчать про те, що використання культури *in vitro* дає змогу з досить високою ефективністю здійснювати пришвидшене масове клональне розмноження селекційного матеріалу тополь. Регенеранти можна отримати як шляхом індукції розвитку апікальних та латеральних бруньок, так і шляхом ініціації формування адвентивних пагонів (Thompson & Gordon, 1977, Coleman & Ernst, 1989). Для культивування тополь дослідники використовували доволі широкий спектр поживних середовищ, різних за складом (Edvin & George, 1996). Так, Welander та співробітники відзначали, що найкращим середовищем для мультиплікації та отримання пагонів було середовище WPM (Welander, Jansson, & Lindqvist, 1989). Y. W. Chan описав успішну ініціацію культури на середовищі, що розроблене Gresshoff & Doy, але видовження і культивування пагонів проводили на середовищі MS (Chun, Hall, Stephens, 1986). Поживне середовище MS є одним із найчастіше вживаних середовищ, які використовують під час культивування ізольованих тканин і органів рослин. Середовище добре збалансоване за мінеральним складом, тому дослідники обирають його як оптимальне для розмноження *in vitro* багатьох представників роду *Populus*: *P. × euramericana* (Agrawal & Gupta, 1991), *P. × canescens* (Mashkina et al., 2010), *P. angustifolia*, *P. balsamifera P. deltoids* (Maheshwari & Kovalchuk, 2011, Yadav et al., 2009) та інших (Erst & Bakulin, 2012).

Існує багато зовнішніх і внутрішніх чинників, від яких залежить успішність мікроклонального розмноження деревних рослин. Найголовнішим із внутрішніх чинників вважають генотип маточного матеріалу. Так, наприклад, успішність вкорінення *Juglans regia* (Scaltsoyiannes et al., 1997) залежно від генотипу може змінюватися від 5 до 95%.

Морфогенетичний потенціал ізольованих тканин значною мірою залежить від тривалості культивування, у багатьох випадках під час перших декількох субкультивувань він зростає. Можливість тривалого культивування певною мірою зумовлена генотипом рослинного матеріалу і для кожного виду, сорту, форми – індивідуальна (Kushnir & Sarnatska, 2005).

Результати з індукції утворення адвентивних пагонів із різних експлантів *Populus* на середовищі MS або ½ MS з додаванням 6-бензиладеніну і НОК або ІМК наведено у роботі (Zeng You-Ling, Yi Li-Juan, & Zhang Fu-Chun, 2006). Wu Shuang-Xiu & Zu Yuan-Gang (2006) вивчали умови отримання органогенезу, каллосу і регенерації рослин із стебел і листків гібрида *P. × langfangensis*. Утворення па-

гонів проходило безпосередньо із судин листка або черешка на середовищі MS з додаванням 1-2 мг/л 6-бензиладеніну і 0,5 мг/л ІМК. Утворення каллосу здійснювали за участю 6-бензиладеніну у концентрації 0,3–0,5 мг/л і НОК або ІМК у концентрації 0,02 мг/л. Ризогенез відбувався на середовищі з додаванням 6-бензиладеніну у концентрації 1,0 мг/л і ІМК у концентрації 0,2–0,5 мг/л.

Вивчення впливу генотипу на успішність введення тополь в культуру *in vitro*, оцінювання впливу сольового складу середовища та концентрації гормонів на можливість ініціації стерильної культури, а також визначення коефіцієнтів мультиплікації та дослідження впливу типу базального середовища та концентрації гормонів на цей показник є актуальними питаннями для вирішення проблеми успішного введення різних генотипів тополь у культуру *in vitro*.

Об'єкти та методика досліджень. *Об'єкт дослідження* – різні генотипи видів і гібридів роду *Populus L.* у зв'язку з їхнім розмноженням у культурі *in vitro*. *Предмет дослідження* – морфогенез, пагоноутворення та мультиплікація різних генотипів тополі в культурі *in vitro*. *Мета досліджень* – визначити оптимальні склад сольового середовища та концентрації гормонів для успішної ініціації культури *in vitro* та мультиплікації різних генотипів тополь.

Вихідним матеріалом для досліджень у культурі *in vitro* були різні генотипи видів і гібридів роду *Populus*, які вирізнялись високою господарською цінністю у дослідно-виробничих і сортовипробувальних культурах, а саме клони тополь української селекції «Новоберлінська», «Дружба», «Гулівер», «Перспективна», «Львівська», «Західна», «Лубенська».

Живці з маточних рослин заготовляли до початку вегетаційного періоду, потім пророщували в лабораторних умовах у склянці з водою для отримання зелених незадерев'янілих пагонів з активними точками росту, які й використовували для введення в культуру *in vitro*. Для стерилізації маточного матеріалу використано дезінфекційні реактиви згідно з методикою, розробленою УкрНДІЛГА, що забезпечило 100% вихід неінфікованих експлантів. Обробляли матеріал побутовим мийним засобом «Domestos» (концентрований розчин натрій гіпохлориту та синтетичних детергентів), розведеним дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3 впродовж п'яти хвилин. Для видалення залишків агресивної речовини матеріал тричі промивали стерильною дистильованою водою. Після цього експланти занурювали в етанол (70%) на 5 хвилин. Після завершення стерилізації матеріал обов'язково триразово промивали стерильною дистильованою водою. У ламінар-боксі висаджували експланти на поживне середовище.

Використано поживні середовища MS (Murashige and Skoog medium), WPM (Woody Plant Medium) та GD (Gresshoff & Doy), які готували із сольових концентратів голландської фірми Dushefa

Chemicals з додаванням агару тієї ж фірми за прописами з комерційного каталогу фірми Dushefa Chemicals (Duchefa biochemical, 2000-2001). До базового середовища додавали 6-бензиладенін (БАП), у концентраціях 0,1-0,3 мг/л.

Після садіння на поживне середовище ініціації експланти витримували 3-4 доби у темряві за температури 23°C, після чого переносили у світлову кімнату з такою ж температурою та освітленням близько 1500 люкс/м² і світловим режимом 16 годин – день / 8 годин – ніч. Кожні чотири тижні експланти пересажували з виснаженого середовища на нове.

Після досягання пагонами довжини 1,5-3 см та утворення сформованих листочків або численних адвентивних бруньок їх використовували для мультиплікації. Кожні чотири тижні пагони розрізали на сегменти з 1-2 міжвузлями та знову садили на відповідне середовище.

Методика досліджень базувалася на системному, комплексному підході, який забезпечує найдостовірніші висновки. Експериментальні матеріали досліджень статистично опрацьовано згідно з прийнятими рекомендаціями (Larach, Chubenco, & Babych, 2001, Dospikhov, 1979). Під час статистичного опрацьовання застосовували методи варіаційної статистики і пакет програм Microsoft Excel.

Результати досліджень. З 2009 р. лабораторією селекції УкрНДІЛГА розпочато дослідження з мікронального розмноження господарсько цінних клонів тополь, а саме етапів ініціації стерильної культури та подальшої мультиплікації отриманого матеріалу. Відпрацьовано методики розмноження клонів тополь живцюванням та клонального мікророзмноження *in vitro*, які зумовлені генотипом рослинного матеріалу і для кожного виду, клону, форми є індивідуальними. За результатами досліджень встановлено, що генотип суттєво впливав на всі досліджувані характеристики. Найважливішим показником, що відображав передусім здатність до ініціації культури, виявилася морфогенезна активність, показники якої суттєво відрізнялись для окремих генотипів, та здатність формування пагонів для подальшої мультиплікації рослин.

Дослідження показали, що морфогенезна активність тополь була достатньо високою на всіх обраних типах середовищ за обох концентрацій гормонів та коливалась в межах 89–95%, показники не мали статистично значущих відмінностей (рис. 1).

Тому найбільшу увагу приділяли показникам пагоноутворення та мультиплікації. Водночас, варто зазначити, що візуально добре помітно суттєву відмінність між експлантами, що росли на різних типах середовищ (рис. 2).

Вплив середовища ініціації на успішність пагоноутворення був доволі суттєвим. Крім того, треба зазначити, що саме сольовий склад середовища мав вирішальне значення (рис. 3, табл. 1).

За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що можливість пагоноутворення на 83,8% зумовлена сольовим складом середовища, на 0,3% – концентрацією гормонів, а

15,9% припадає на дію чинників, що не підлягали обліку, в тому числі на вплив генотипу.

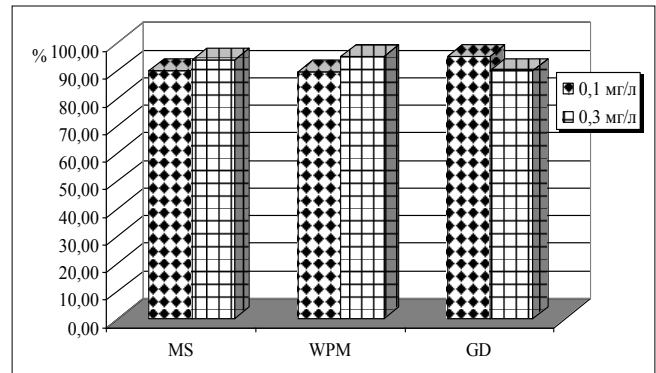


Рис. 1. Вплив середовища ініціації та концентрації гормонів на морфогенезну активність (у % від загальної кількості стерильних експлантів)

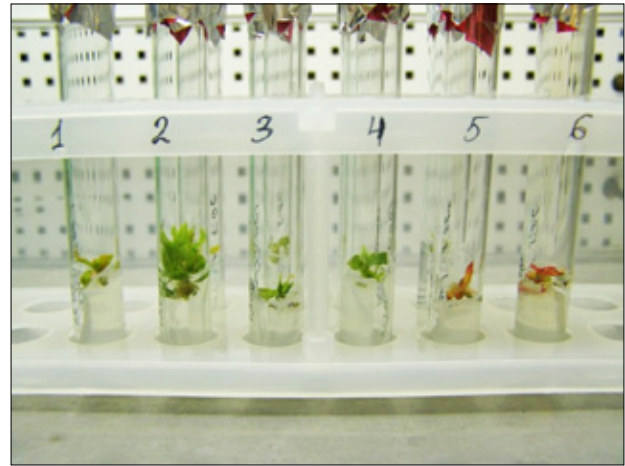


Рис. 2. Ріст і розвиток пагонів на різних типах середовищ (1 – MS + 0,1 мг/л БАП; 2 – MS + 0,3 мг/л БАП; 3 – WPM + 0,1 мг/л БАП; 4 – WPM + 0,3 мг/л БАП; 5 – GD + 0,1 мг/л БАП; 6 – GD + 0,3 мг/л БАП)

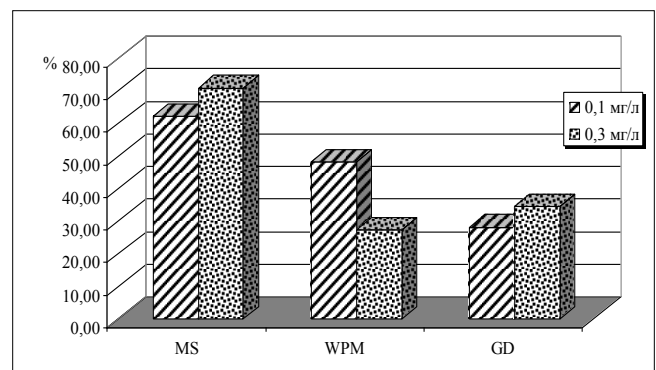


Рис. 3. Вплив середовища ініціації та концентрації гормонів на пагоноутворення (у % від експлантів, що проявляли морфогенезну активність)

Найкращим для ініціації стерильної культури, особливо для отримання пагонів, виявилось середовище MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л, хоча ефективним є також використання БАП у менших концентраціях.

Таблиця 1

Показники пагоноутворення на різних етапах середовищ (у % від загальної кількості морфогенезно активних експлантів)

Концентрація БАП	MS	WPM	GD
0,1 мг/л	62,11 ± 4,85	47,92 ± 5,00	28,04 ± 4,49
0,3 мг/л	70,73 ± 4,55	27,28 ± 4,45	34,51 ± 4,75

Оскільки морфогенезна активність на всіх середовищах виявилася доволі високою і суттєво відрізнялися лише показники інтенсивності пагоноутворення, на етапі мультиплікації раціональним було використати ті ж середовища, що і на попередньому етапі. Мультиплікація матеріалу можлива, по-перше, за рахунок розрізання довгих пагонів на окремі міжвузля та їх подальшого культивування, та, по-друге, за рахунок утворення адвентивних бруньок, з яких згодом відбувається утворення одночасно декількох пагонів. Зазвичай, другий варіант дає змогу отримати набагато більший коефіцієнт мультиплікації. Тому для кожного варіанта середовища звертали увагу на інтенсивність пагоноутворення (кількість пагонів у % від загальної кількості експлантів з морфогенезною активністю), здатність до формування адвентивних бруньок, коефіцієнт мультиплікації (збільшення кількості експлантів, порівняно з попереднім пасажем). Облік усіх показників проводили для декількох послідовних пасажів та підраховували середнє значення для кожного з них.

Для отримання великої кількості повноцінних пагонів надзвичайно важливим є підбір середовища, тому в обчисленні показника мультиплікації варто приділяти увагу не лише загальній частці пагоноутворення, але й якості отриманих пагонів, тобто доцільно окремо розділити добре видовжені пагони та пагони з короткими міжвузлями.

Найбільшу частку пагоноутворення отримали на середовищі MS (61,7 та 72,3% з додаванням БАП у концентрації 0,1 мг/л та 0,3 мг/л відповідно). Але потрібно зазначити, що найбільшу кількість добре видовжених пагонів отримували на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л. На середовищі WPM показник пагоноутворення не суттєво відрізнявся від відповідного показника, отриманого на середовищі MS, але переважно формувалися короткі пагони, що не дає змоги отримати високий коефіцієнт мультиплікації. Найгіршим виявилось середовище GD (табл. 2).

Найнефективнішим для тополі є мультиплікація за рахунок адвентивних бруньок, тому що з одного експланту можна отримати декілька добре сформованих пагонів і завдяки цьому значно підвищити коефіцієнт мультиплікації (рис. 4). Сольовий склад середовища впливав на формування достатньої кількості пагонів, але найбільше цей показник залежав від концентрації гормонів (табл. 3).

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що формування адвентивних бруньок на експланті на 69% зумовлено концентрацією гормонів, на 22% – сольовим складом середовища, а 9% припадає на дію чинників, що не підлягали обліку. Тому для формування адвентивних бруньок варто використовувати БАП у концентрації 0,3 мг/л та середовище MS, хоча доволі значна кількість адвентивних бруньок формувалась також і на середовищі GD (див. табл. 3).

Таблиця 2

Вплив середовища мультиплікації на пагоноутворення (у % від загальної кількості морфогенезно активних експлантів)

Середовище	Частка коротких пагонів	Частка довгих пагонів	Разом
MS + 0,1 мг/л БАП	55,00 ± 4,54	6,67 ± 2,28	61,67 ± 4,44
MS + 0,3 мг/л БАП	57,33 ± 2,82	14,98 ± 2,04	72,31 ± 2,55
WPM + 0,1 мг/л БАП	66,67 ± 5,34	2,56 ± 1,79	69,23 ± 5,23
WPM + 0,3 мг/л БАП	58,76 ± 5,00	1,03 ± 1,03	59,79 ± 4,98
GD + 0,1 мг/л БАП	44,05 ± 5,42	0	44,05 ± 5,42
GD + 0,3 мг/л БАП	33,85 ± 4,15	0,77 ± 0,77	34,62 ± 4,17

Таблиця 3

Вплив середовища та концентрації БАП на формування адвентивних бруньок (у % від загальної кількості морфогенезно активних експлантів)

Концентрація БАП	MS	WPM	GD
0,1 мг/л	11,67 ± 2,93	3,85 ± 2,18	3,57 ± 2,02
0,3 мг/л	59,61 ± 2,80	22,68 ± 4,25	36,92 ± 4,23

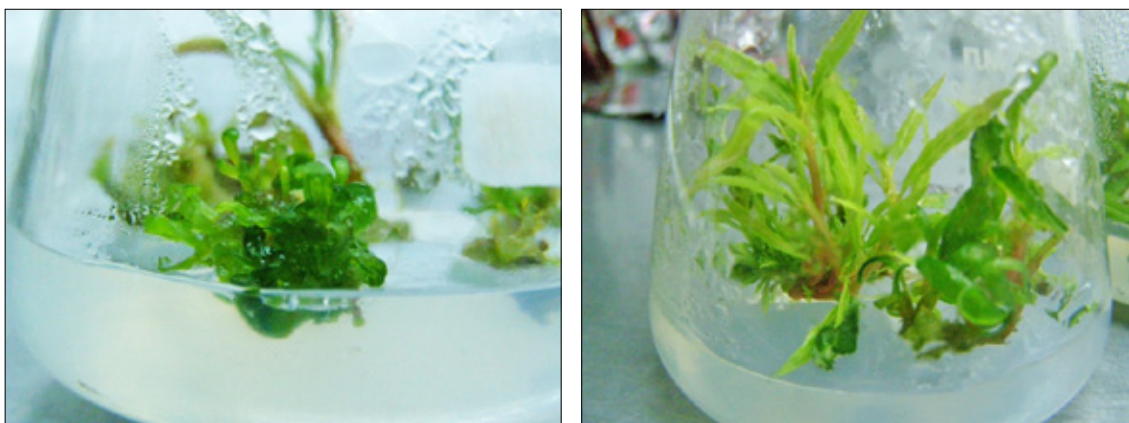


Рис. 4. Формування адвентивних бруньок та подальший ріст пагонів

Для всіх варіантів середовищ підраховано коефіцієнт мультиплікації (рис. 5) і виявлено, що найвищим він був на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л.

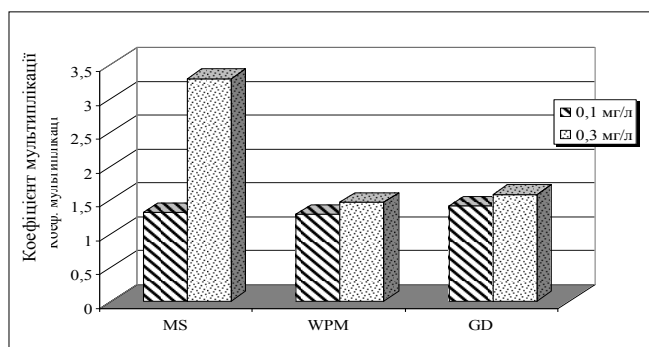


Рис. 5. Показники коефіцієнтів мультиплікації залежно від різних типів середовищ та концентрацій БАП

У межах кожного виду суттєвим є вплив окремих генотипів, у цьому випадку клонів, на здатність до мікроклонального розмноження. Досліджено сім перспективних клонів тополь: «Західна», «Перспективна», «Лубенська», «Львівська», «Гулівер», «Дружба», «Новоберлінська». Генотип суттєво впливав на всі досліджувані характеристики. Найважливішим показником, що відображав передусім здатність до ініціації культури, була морфогенезна активність, показники якої суттєво відрізнялись для окремих генотипів, та здатність формування пагонів для подальшої мультиплікації (табл. 4).

Після декількох пасажів клон адаптувався до культуральних умов, і морфогенезна активність для всіх генотипів становила 90% і більше, тому для подальшого вивчення мультиплікації має значення лише частка пагоноутворення та можливість формування адвентивних бруньок (табл. 5).

Таблиця 4

Показники морфогенезної активності та пагоноутворення залежно від генотипу на стадії ініціації культури (%)

Клон	Морфогенезна активність	Пагоноутворення
«Західна»	47,50 ± 4,99	63,89 ± 4,80
«Перспективна»	84,77 ± 3,59	37,76 ± 4,85
«Лубенська»	87,46 ± 3,31	33,10 ± 4,71
«Львівська»	59,11 ± 4,92	49,37 ± 5,0
«Гулівер»	72,56 ± 4,46	31,67 ± 4,65
«Дружба»	92,20 ± 2,68	64,48 ± 4,79
«Новоберлінська»	88,89 ± 3,14	55,52 ± 4,97

Таблиця 5

Показники пагоноутворення залежно від генотипу на стадії мультиплікації (%)

Клон	Пагоноутворення	Адвентивні бруньки
«Західна»	72,22 ± 7,47	44,44 ± 8,28
«Перспективна»	36,62 ± 5,60	9,59 ± 3,45
«Лубенська»	40,00 ± 5,03	6,32 ± 2,50
«Львівська»	65,38 ± 4,67	7,69 ± 2,61
«Гулівер»	62,09 ± 3,60	42,86 ± 3,67
«Дружба»	81,97 ± 3,48	58,20 ± 4,47
«Новоберлінська»	58,33 ± 3,45	42,65 ± 3,46

Найкращими показниками пагоноутворення вирізнялися клони «Західна» та «Дружба», середні показники були у клонів «Львівська», «Гулівер» та «Новоберлінська», і найгірше пагони утворювали клони «Перспективна» та «Лубенська».

Деякі клони на досліджених середовищах нездовільно формували адвентивні бруньки, але це не виключає можливості їх формування за інших культуральних умов. Найкращу здатність до формування адвентивних бруньок виявляли клони «Західна», «Гулівер», «Дружба» і «Новоберлінська».

Властивість клонів з різною частотою формувати пагони та адвентивні бруньки залежно від культуральних умов, суттєво впливає на коефіцієнт мультиплікації (табл. 6).

Майже для всіх клонів коефіцієнт мультиплікації був достатньо позитивним на середовищах MS та GD з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л. В інших варіантах коефіцієнти мультиплікації для

окремих клонів іноді були меншими за одиницю, що свідчить про непридатність таких варіантів середовища для культивування відповідного клону. Найкращим і, загалом, універсальним для цього виду треба визнати середовище MS + БАП 0,3 мг/л, на якому коефіцієнт мультиплікації для окремих генотипів досягав 9,25. Варто також наголосити, що впродовж наступних пасажів цей показник буде підвищуватися, оскільки рослини поступово адаптуються до культуральних умов.

Необхідно звернути особливу увагу на те, що серед досліджених клонів можна виділити такі, що мали майже однаковий коефіцієнт мультиплікації на всіх зазначених середовищах (не враховуючи середовища MS, що виявилось найкращим для всіх клонів), наприклад «Західна» та «Новоберлінська», тоді як деякі клони, наприклад «Дружба», могли стабільно розвиватися лише на окремих типах середовищ.

Таблиця 6

Значення коефіцієнтів мультиплікації для різних клонів за різних культуральних умов

Клон	MS		WPM		GD	
	0,1 мг/л	0,3 мг/л	0,1 мг/л	0,3 мг/л	0,1 мг/л	0,3 мг/л
«Західна»	1,67	3,88	1,75	2,83	2,33	2,00
«Перспективна»	1,20	1,44	0,83	1,00	1,25	1,87
«Лубенська»	1,03	1,69	1,38	0,92	0,91	1,34
«Львівська»	1,30	1,53	1,24	0,70	1,00	1,25
«Гулівер»	1,73	1,83	1,00	1,46	1,25	1,55
«Дружба»	0,75	9,25	1,18	1,83	1,55	1,35
«Новоберлінська»	1,51	3,43	1,58	1,51	1,56	1,68

Висновки. Застосування методів культури ізольованих органів *in vitro* є перспективним напрямом для масового відтворення і збереження цінного генотипу деревних рослин, зокрема клонів тополь української селекції. Найважливішим аспектом успішності ініціації стерильної культури тополь є вибір материнської рослини й склад базового середовища, що включає оптимальну кількість гормонів.

Найвищу морфогенезну активність відзначено у клонів тополь: «Перспективна», «Лубенська», «Дружба» та «Новоберлінська», дещо гірше – «Гулівер», найскладнішими для введення в культуру виявилися клони «Західна» та «Львівська».

Проліферація пагонів найінтенсивніше відбувалася у клонів тополь «Дружба» та «Західна», дещо гірше – у клонів «Львівська» та «Новоберлінська». В інших клонів інтенсивність пагоноутворення була низькою, незважаючи на досить високу морфогенезну активність.

Найкращу здатність до формування адвентивних бруньок виявили клони «Західна», «Гулівер», «Дружба» і «Новоберлінська».

Універсальним для мікророзмноження тополь української селекції є середовище MS із додаванням 6-бензиладеніну у концентрації 0,3 мг/л.

Бібліографічні посилання

- Agrawal, V., & Gupta, S.C. (1991). *In vitro* plantlet development from explants of 25-year-old tress of *P. × euramericana* – a hybrid poplar. *Plant Science*, 78 (1), 99-105. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90166-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90166-6)
- Chun, Y.W., Hall, R.B., & Stephens, L.C. (1986). Influence of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba* x *P. grandidentata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 179-185. <https://doi.org/10.1007/BF00040128>
- Coleman G.D., & Ernst S.G. (1989). *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype. *Plant Cell Reports*, 8 (8), 459-462. <https://doi.org/10.1007/BF00269048>
- Dospikhov, B.A. (1979). *Field experiment techniques (with the basics of statistical processing of research results)*. Moscow: Kolos (in Russian).
- Duchefa biochemical* (2000-2001). Catalogue.
- Edvin, F., & George, P.D. (1993/1996) *Plant propagation by tissue culture*. Part 2 In practice. 2-nd edition. Exgenetics Limited.
- Erst, A.A., & Bakulin, V.T. (2012). Clonal micropropagation of siberian silver poplar. *Turczaninowia*, 15 (1), 58-62 (in Russian).

- Fuchylo, Ya., Maurer, V., Sbytna, M., Odarchenko, I., & Fuchylo, D. (2016). Features of woody biomass and planting-stock of poplar in «stump» type of plantation management. *Scientific works of the Forestry Academy of Sciences of Ukraine*, 14, 134-140 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15421/411618>
- Kushnir, G.P., & Sarnatska, V.V. (2005). *Micro-propagation of plants*. Kyiv: Scientific thought (in Ukrainian)
- Lapach, S. N., Chubenco, A. V., & Babych, P. N. (2001). *Statistical methods in biomedical research using Excel (2nd ed.)*. Kyiv: Morion (in Russian).
- Maheshwari, P., & Kovalchuk, I. (2011). Efficient shoot regeneration from intermodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoides*. *New Biotech*, 28 (6), 778-787.
- Mashkina, O. S., Sivolapov, A. I., & Tabatskaya, T. M. (2010). Cytogenetic certification of gray poplar's clones of propagated *in vitro*. Materials of the All-Russian *scientific-practical* a conference with international participation dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor Mikhail Mikhailovich Veresin: *Genetics, selection, seed production and reproduction of tree species*, 23-37. Voronezh, Russia: Fed Education Agency, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Voronezh State Forestry Engineering Academy» (in Russian).
- Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K. P., & Moulalis, D. (1997). Effect of Genotype on Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica*, 46, 326-332.
- Thompson D. G., & Gordon J. C. (1977). Propagation of poplar by shoot apex culture and nutrient film technique. *Tappi Conference Papers: Forest Biology & Wood Chemistry*, 77-82.
- Vysotska, N. Yu. (2017). Current state and prospects of the poplar genetic resources conservation in Ukraine. *Proceedings of the Forestry Academy of Sciences of Ukraine*, 15, 38-44 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15421/411705>
- Welander, M., Jansson, E., & Lindqvist, H. (1989). In vitro propagation of *Populus x wilsocarpa* – a hybrid of ornamental value. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 18, 209-219.
- Wu Shuang-Xiu, & Zu Yuan-Gang (2006). In vitro regeneration of *Populus langfangensis* 3 for transformation and micropropagation. *Bulletin of Botanical Research*, 26 (2), 201-205. <https://doi.org/10.1080/07929978.2015.1076982>
- Yadav, R., Aror, P., Kumar, D., Katyal, D., Dilbaghi, N., & Chaudhury, A. (2009). High frequency direct plant regeneration from leaf, internode and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*). *Plant Biotechnology Reports*, 3, 175-182. <https://doi.org/10.1007/s11816-009-0088-5>
- Zeng You-Ling, & Yi Li-Juan, Zhang Fu-Chun (2006). Analysis of proliferation of adventitious shoot and regeneration poplar plants. *Bulletin of Botanical Research*, 26 (3), 329-332.

Особенности микрклонального размножения ценных генотипов рода *Populus L. in vitro*

Н. Ю. Высоцкая¹ И. В. Золотых²

Исследованы особенности морфогенеза, процесса побегообразования и мультипликации разных генотипов тополя в культуре *in vitro*, которые отличались высокой хозяйственной ценностью в опытно-производственных и сортоиспытательных культурах. Определен оптимальный состав солевой среды и концентрации гормонов для успешной инициации культуры *in vitro*, побегообразования и мультипликации. Разработаны протоколы введения в культуру *in vitro* семи перспективных клонов украинской селекции тополей: «Западная», «Перспективная», «Лубенская», «Львовская», «Гулливер», «Дружба», «Новоберлинская».

Черенки из маточных растений заготавливали до начала вегетационного периода, затем проращивали в лабораторных условиях для получения зеленых не одревесневших побегов с активными точками роста, которые использовали для введения в культуру *in vitro*. Для стерилизации маточного материала использованы дезинфекционные реактивы согласно методике, разработанной УкрНИИЛХА, что обеспечило 100%-ный выход неинфицированных эксплантов. Обработку материала проводили бытовым моющим средством «Domestos» (концентрированный раствор натрия гипохлорита и синтетических моющих средств), разведенным дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 в течение пяти минут. Для удаления остатков агрессивного вещества материал трижды промывали стерильной дистиллированной водой. После этого экспланты погружали в этанол (70%) на 5 минут. По окончании стерилизации материал трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. В ламинарном боксе высаживали экспланты на питательную среду.

Использованы питательные среды MS (Murashige and Skoog medium), WPM (Woody Plant Medium) и GD (Gresshoff & Doy), которые готовили из солевых концентратов с добавлением агара по прописям из коммерческого каталога фирмы Dushefa Chemicals. К базовой среде добавляли 6-бензиладенин, в концентрациях 0,1-0,3 мг/л.

¹ Высоцкая Наталья Юрьевна – член-корреспондент Лесной академии наук Украины, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, первый заместитель директора по научным вопросам Украинского ордена «Знак Почета» научно-исследовательского института лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.Н. Высоцкого, ул. Пушкинская, 86, г. Харьков, 61024, Украина. Тел.: +0577078059. E-mail: vysotska_n@ukr.net, vysotska@uriffm.org.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3033-2036>

² Золотых Ирина Витальевна – научный сотрудник лаборатории селекции Украинского ордена «Знак Почета» научно-исследовательского института лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.Н. Высоцкого, ул. Пушкинская, 86, г. Харьков, 61024, Украина. Тел.: +0577078049. E-mail: zolot_irina@yandex.ru

Установлено, что морфогенезная активность всех исследованных клонов тополей после нескольких пассажей была достаточно высокой на всех избранных типах сред независимо от концентрации 6-бензиладенина. В то же время, влияние среды инициации на успешность побегообразования было довольно существенным. Двухфакторным дисперсионным анализом установлено, что возможность побегообразования на 83,8% обусловлена солевым составом среды, на 0,3% – концентрацией гормонов, а 15,9% приходится на действие факторов, которые не подлежали учету, в том числе на влияние генотипа. Наибольший процент побегообразования получили на среде MS (61,7% и 72,3% с добавлением 6-бензиладенина в концентрации 0,1 мг/л и 0,3 мг/л соответственно). Установлено, что формирование адвентивных почек на експлантах на 69% обусловлено концентрацией гормонов, на 22% – солевым составом среды, а 9% приходится на действие других факторов. Подтверждено значительное влияние генотипа на все исследуемые характеристики. Самой высокой морфогенетической активностью отличались клоны тополей «Перспективная», «Лубенская», «Дружба» и «Новоберлинская». Пролиферация побегов интенсивно происходила у клонов «Дружба» и «Западная». Лучшую способность к формированию адвентивных почек проявляли клоны «Западная», «Гулливер», «Дружба» и «Новоберлинская».

Универсальной для микроразмножения тополей украинской селекции является среда MS с добавлением 6-бензиладенина в концентрации 0,3 мг/л.

Ключевые слова: тополь; генотип; микроразмножение; питательная среда; 6-бензиладенин; морфогенез; побегообразование; адвентивные почки; мультипликация.

Particularities of micropropagation of valuable genotypes of the genus *Populus L. in vitro*

N. Vysotska¹, I. Zolotykh²

The peculiarities of morphogenesis, the process of shoot proliferation multiplication of different genotypes of poplar in culture in vitro, which were distinguished by high economic value in experimental plots, forest plantation and variety test plots, were studied. The

¹ *Natalia Vysotska* – Corresponding Member of the Forestry Academy of Sciences of Ukraine, PhD in Agricultural Sciences, Deputy Director for Science of the Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G.M. Vysotsky, Pushkinska Str., 86, Kharkiv, 61024, Ukraine. Phone: +0577078059. E-mail: vysotska_n@ukr.net, vysotska@uriffm.org.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3033-2036>

² *Irina Zolotykh* – research officer of the Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G.M. Vysotsky, Pushkinska Str., 86, Kharkiv, 61024, Ukraine. Phone: +0577078049. E-mail: zolot_irina@yandex.ru

optimal composition of the culture medium and the concentration of hormones for the initiation of the in vitro culture, shoot proliferation and multiplication was determined. An accurate protocols for the in vitro propagation of the 7 clones Ukrainian breeding of poplars: «Zahidna», «Perspectivna», «Lubens'ka», «L`vivs'ka», «Gulliver», «Druzhba», «Novoberlins'ka» have been developed. The cuttings from the plants were harvested before the beginning of the growing season. Annual shoots were germinated under laboratory conditions to produce green non-lignified shoots with active growth points, which were used for in vitro culture. Origin of plant material was sterilized with used the method developed by the URIFFM.

Surface sterilization: plant material was immersed in household detergent «Domestos» (a concentrated solution of sodium hypochlorite and synthetic detergents) diluted with distilled water on a 3 : 1 ratio for 5 minutes.

Plant material was washed three times with sterile distilled water to remove residual corrosive substances.

After this, the explants were immersed in ethanol (70%) for 5 minutes. At the end of sterilization, the material was washed three times with sterile distilled water. Explants were planted on a culture medium under conditions of the laminar box.

In our experiments MS (Murashige and Skoog medium), WPM (Woody Plant Medium) and GD (Gresshoff & Doy) medium supplemented with 0.1-0.3 mg/l 6-benzyladenine (BAP) were used.

Morphogenetic activity of all studied poplars clones after several passages was high in all selected cultural medium and all concentration of 6-benzyladenine. At the same time, the influence of the cultural medium on the success of shoot proliferation was significant.

The possibility of shoot proliferation was due to the salt composition of the culture medium (83.8%), by the concentration of hormones (0.3%), and 15,9% was due to the action of factors that were not counted, including the influence of the genotype. Shoot proliferation was slightly better on the MS medium (61.7% and 72.3% with the addition of 6-benzyladenine at a concentration of 0.1 mg/l and 0.3 mg/l, respectively). It was established that the formation of adventitious buds by explants was due to the concentration of hormones (69%), by the salt composition of the medium (22%), and by the action of other factors (9%).

It was also observed that the genotype has been significant effect on all the characteristics that were studied. The most promising morphogenetic activities were clones of poplars «Perspectivna», «Lubenska», «Druzhba», and «Novoberlins'ka». The proliferation of shoots occurred intensively in the clones of «Druzhba» and «Zahidna». Clones of «Zahidna», «Gulliver», «Druzhba» and «Novoberlins'ka» showed the best ability to form adventitious buds. Bud initiation and shoot proliferation were found to be best on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 6-benzyladenine at a concentration of 0,3 mg/l (BAP).

Key words: poplar; genotype; micropropagation; cultral medium; 6-benzyladenine; morphogenesis; shoot proliferation; adventitious buds; multiplication.