

**Кабылбекова Б.Ж.^{1*}, Чуканова Н.И.², Турдиев Т.Т.³,
Рымханова Н.⁴, Ковальчук И.Ю.⁵**

^{1*}научный сотрудник, e-mail: kabylbekova.balnur@gmail.com

²инженер, e-mail: chukanova_n_i@mail.ru

³кандидат биологических наук, e-mail: turdievtt@mail.ru

⁴магистр, младший научный сотрудник, e-mail: nazka_0993@mail.ru

⁵кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: kovalchuk_i_u@mail.ru

^{1,2,5} Казахский НИИ плодовоовощеводства, Казахстан, г. Алматы

^{3,4,5} Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

**ОПТИМИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАНИЯ
IN VITRO РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ**

На каждом этапе клонального микроразмножения растений появляются трудности, такие как неудачная стерилизация, слабое размножение, аномальное развитие микрорастений, а также фенольное окисление растений в питательной среде. Последствия таких неудач могут привести к некрозу растений, а иногда и гибели. Успешное микроразмножение растений зависит от нескольких внутренних и внешних факторов, включая условия *ex vitro* и *in vitro*. Для достижения высокого коэффициента размножения растений *in vitro* важно создавать оптимальные условия на каждом этапе клонального микроразмножения. В статье представлены результаты усовершенствования технологии клонального микроразмножения растений яблони на различных этапах. Проведённые эксперименты показали, что побеги яблони эффективно стерилизовать 0,2% HgCl₂ в экспозиции 4 мин. В этом случае количество эксплантов, способных регенерировать составляет у сорта Голден Делишес 76%, у сорта Восход – 85%, у сорта Максат – 75%. Лучшей для изоляции эксплантов является среда МС, содержащая удвоенное количество хелата железа, 1,5 мг/л витамина С, 250 мг/л поливинилпирролидона, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК (получено 79% регенерирующих побегов яблони). Оптимальная среда для клонального микроразмножения – минеральная основа МС, содержащая 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК. В культуру *in vitro* введены и размножены 36 сортов и 9 дикорастущих форм яблони.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, *in vitro*, стерилизация, питательная среда, яблоня.

Kabylbekova B.Zh.¹, Chukanova N.I.², Turdiyev T.T.³,
Rymkhanova N.⁴, Kovalchuk I.Y.⁵

^{1*}Researcher, e-mail: kabylbekova.balnur@gmail.com

²Engineer, e-mail: chukanova_n_i@mail.ru

³Candidate of Biological Sciences, e-mail: turdievtt@mail.ru

⁴MA, Junior Researcher, e-mail: nazka_0993@mail.ru

⁵Candidate of Agricultural Sciences, e-mail: kovalchuk_i_u@mail.ru

^{1,2,5}Qazaq Research Institute of Fruit & Vegetable Growing, Kazakhstan, Almaty

^{3,4,5}Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

Optimization of the cloning *in vitro* different apple genotypes

At each stage of plant clonal micropropagation appear difficulties, such as a failed sterilization, poor reproduction, abnormal development of microplants and phenolic oxidation plants in a nutrient medium. The consequences of such failures can lead to plant necrosis, and sometimes death. Successful micropropagation of plants depends on several internal and external factors, including *ex vitro* and *in vitro* conditions. It is important to create optimal conditions at each stage of micropropagation to achieve a high multiplication coefficient of *in vitro* plants. The article presents the results of improving the technology of clonal micropropagation of apple plants at different stages. Experiments conducted have shown that apple shoots are effectively sterilized with 0,2% HgCl₂ at an exposure of 4 min. In this case, the number of explants capable of regenerating is 76% for variety Golden Delicious, 85% for variety Voskhod, 75% for variety Maksat. The best medium for isolating explants is MS medium containing double amount of iron chelate; vitamin C -1.5 mg/l; polyvinylpyrrolidone – 250 mg/l; glycine – 2 mg/l; BAP – 0.5 mg/l; The IMC is 0.1 mg/l, 79% of regenerating apple shoots were obtained with such a

composition of the nutrient medium. The optimal medium for micropropagation of apple is the mineral basis of MS with a hormonal composition: 1.0 mg/l BAP, 0.1 mg/l IMC, 0.1 mg/l NA. The multiplication coefficient of the studied cultivars ranged from 4 to 13 depending on the genotype. 36 cultivars and 9 wild forms of apple are introduced into in vitro culture and propagated.

Key words: clonal micropropagation, in vitro, sterilization, nutrient medium, apple.

Кабылбекова Б.Ж.^{1*}, Чуканова Н.И.², Турдиев Т.Т.³,
Рымханова Н.⁴, Ковальчук И.Ю.⁵

^{1*}ғылыми қызметкер, e-mail: kabylbekova.balnur@gmail.com

²инженер, e-mail: chukanova_n_i@mail.ru

³биология ғылымдарының кандидаты, e-mail: turdievtt@mail.ru

⁴магистр, кіші ғылыми қызметкер, e-mail: nazka_0993@mail.ru

⁵ауыл шаруашылық ғылымдарының кандидаты, e-mail: kovalchuk_i_u@mail.ru

^{1,2,5}Қазақ жеміс-көкөніс шаруашылығы институты, Қазақстан, Алматы қ.

^{3,4,5}Өсімдік биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

Алманың әр түрлі генотиптерін in vitro клондауды оңтайландыру

Өсімдіктерді клонды микрокөбейтудің әр сатысында сәтсіз залалсыздандыру, әлсіз көбею, микроөсімдіктердің аномальды өзгерістері, сонымен қатар өсімдіктердің қоректік ортада фенолдық қышқылдануы тәрізді қиындықтар туады. Осындай сәтсіздіктердің соңы өсімдіктердің қараюына (некроз), ал кей жағдайда жоғалуына әкеп соғады. Өсімдіктерді сәтті микрокөбейту бірнеше ішкі және сыртқы факторларға, сондай-ақ ex vitro және in vitro жағдайына да байланысты болады. In vitro жағдайында өсімдікті көбейтудің жоғары коэффициентіне қол жеткізу үшін клонды микрокөбейтудің әр бір сатысында оңтайлы жағдай жасау маңызды. Мақалада әр түрлі кезеңде алма өсімдіктерін клонды микрокөбейту технологиясын жетілдіру нәтижелері баяндалған. Жүргізілген эксперименттер алманың микроөскін HgCl₂ 0,2% 4 минуттық экспозицияда залалсыздандырған тиімді екендігін көрсетті. Бұл жағдайда регенерацияға қабілетті экспланттар саны Голден Делишес сортында – 76%, Восход – 85%, Максат – 75% құрады. Құрамында екі еселенген темір хелаты; С дәрумен -1,5 мг/л; поливинилпирралидон – 250 мг/л; глицин – 2 мг/л; БАП – 0,5 мг/л; ИМҚ – 0,1 мг/л МС қоректік ортасы экспланттарды қоректік ортаға оқшаулауға ең абзалы (регенерацияға қабілетті 79% алма өскін алынды). Клонды микрокөбейтуге оңтайлы қоректік орта – МС минералдық ортасы, құрамында: 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМҚ, 0,1 мг/л ГҚ. In vitro ортасына алманың 36 сорты және 9 жабайы формалары енгізілді және көбейтілді.

Түйін сөздер: клонды микрокөбейту, in vitro, залалсыздандыру, қоректік орта, алма.

Введение

Яблоня – основная плодовая культура в странах умеренного климата характеризующаяся высокой адаптивностью по сравнению с другими плодовыми культурами, ценными свойствами плодов, доступными в течение практически всего года. В южных и юго-восточных регионах Казахстана сложились исключительно благоприятные условия для выращивания яблони. Однако темпы развития отрасли плодоводства и существующий сегодня сортимент не в полной мере отвечают современным требованиям интенсификации. Доля импорта плодовой продукции составляет около 50%, то есть находится у «красной черты», превышение которой может привести к зависимости страны от импортных поставок. При этом поступающая на отечественный продовольственный рынок импортная продукция не всегда отвечает требованиям качества, срокам хранения и безопасности для здоровья.

В результате проводимой в течение восьми десятилетий селекционной работы на основе обширного генофонда, используемого в качестве исходного материала в Казахском НИИ плодовоовощеводства создан ряд новых сортов, характеризующихся высокой конкурентоспособностью. Сорта нового поколения включены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан. Они имеют высокую продуктивность и качество плодов, устойчивы к наиболее распространенным заболеваниям, и характеризуются высоким адаптивным потенциалом. Однако внедрение новых отечественных и интродуцированных сортов и подвоев в практическое садоводство затруднено медленными темпами размножения посадочного материала. Для ускорения этого процесса целесообразно включить в технологию производства биотехнологические методы, в частности клональное микроразмножение, что даст возможность бы-

стро размножить генотипы и протестировать их на отсутствие или присутствие патогенов.

Для клонального микроразмножения часто используют базовые питательные среды: Мура-сиге и Скуга (1962), Lepoivre (Quoirin и Lepoivre 1977), Driver-Kuniyuki Walnut (Driver и Kuniyuki 1984) и Woody Plant Medium (Lloyd и McCown 1980). В литературе имеется достаточно много сведений об изучении различных этапов клонального микроразмножения. История культуры тканей яблони относится к концу 1960-х началу 1970-х годов [1-3]. В последующие десятилетия ряд ученых определили методику, подходящую для микроразмножения яблони, которая и стала началом активного применения культуры *in vitro* [4-9]. Позже микроразмножение яблони сыграло важную роль в производстве оздоровленного посадочного материала сортов и подвоев. Однако опубликованные исследования по клональному микроразмножению отдельных сортов, не всегда могут быть использованы для других генотипов, поскольку проявляется сорто-специфичность и требуемые факторы культивирования могут значительно отличаться у каждого конкретного генотипа.

Практические работы по клональному микроразмножению казахстанских сортов, особенно по введению в асептическую культуру не были успешны. В связи с этим возникла необходимость подбора условий стерилизации эксплантов и оптимизации питательных сред для изоляции и клонирования *in vitro*.

Представленные исследования направлены на усовершенствование регламента клонального микроразмножения для внедрения ускоренного массового размножения казахстанских сортов в практику питомниководства.

Материалы и методы исследования

Растительный материал – побеги сортов яблони казахстанской и зарубежной селекции, а также отобранные формы дикорастущей яблони *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem., собранные в коллекционных насаждениях Помологического сада Казахского НИИ плодоовощеводства.

Оптимизация условий клонирования заключалась в подборе эффективных стерилизующих препаратов при введении апексов *in vitro* и гормонального состава питательных сред, регулирующих регенерационные механизмы эксплантов, изолированных на искусственные питательные среды, пролиферацию и размножение в асептической культуре.

Вычленение апексов и пересадку проводили в ламинарных боксах предварительно стерилизованных кварцевой или бактерицидной лампами. Апексы стерилизовали от сапрофитной микрофлоры, которая препятствует развитию эксплантата на среде и высаживали на питательную среду. Через некоторое время образовавшиеся розетки или микропобеги пересаживали на среду для пролиферации и размножения. Микроразмножение проводили в термостатируемых комнатах с освещённостью $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16-ти часовым фотопериодом, температурой $+23-25^\circ\text{C}$. Питательные среды разливали в культуральные сосуды (Magenta GA7) по 40 мл и автоклавировали при давлении 1 атм. 30 мин. Повторность опытов 5-10-ти кратная.

Введение в культуру *in vitro* проводили в два периода: первый – искусственно инициировали рост побегов из спящих почек в период покоя (январь-февраль), второй – в период активного роста (май-июнь). Инициацию проращивания почек проводили в лабораторных условиях в сосудах с раствором 1/2 макро- и микроэлементов по Мура-сиге и Скугу (МС). Отросшие побеги или верхушки активно растущих побегов (не менее 10 каждого генотипа) изолировали, отмывали в мыльном растворе, ополаскивали в дистиллированной воде. Затем погружали в стерилизующий препарат с различной концентрацией и экспозицией. После чего промывали 3 раза в стерильной воде и высаживали на питательную среду МС с соответствующими добавками. Экспланты пересаживали на свежие среды ежедневно.

Тест на скрытое инфицирование сапрофитной и патогенной микрофлорой проводили в чашках Петри на провокационной среде VISS, которая содержит 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л KH_2PO_4 , 15 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 г/л джелрайта [10]. Для проверки инфицированности экспланта у побега срезали базальную часть и инкубировали на среде в течение 1-3 недель, за это время выявляется большинство внутренних системных инфекций. Наблюдения за растениями, введёнными *in vitro*, проводили еженедельно, при этом учитывали число живых, погибших и инфицированных эксплантов.

Оптимизировали гормональный состав для клонирования *in vitro* растений яблони. На основе среды МС испытывали регуляторы роста 6-бензиламинопури-н (БАП), индолилмасляную кислоту (ИМК) и гибберелловую кислоту (ГК) в различных концентрациях. Пересадку на свежие питательные среды, наблюдения и учёт прово-

дили ежемесячно, отмечали состояние и число образовавшихся побегов, рассчитывали коэффициент размножения средний за 1 пассаж для каждого генотипа по формуле: $K_p = a/10b \cdot v$; (а – количество вновь образовавшихся побегов; б – количество побегов, высаженных для размножения; в – количество пассажей).

Результаты исследования и их обсуждение

Объекты исследований

Исследования проведены на сортах яблони отечественной и зарубежной селекции, а также на формах дикорастущей яблони *M. Sieversii*.

Введение *in vitro*

Изоляция побегов и введение в асептические условия является ответственным этапом клонального микроразмножения растений. Произрастая в полевых условиях растения накапливают огромное количество сапрофитной и патогенной микрофлоры, которая при попадании на искусственные питательные среды активно размножается и препятствует развитию растений в условиях *in vitro*. В местах произрастания растений складывается индивидуальный биоценоз микрофлоры свойственный конкретному месту произрастания, который зависит от вида, культуры и генотипа растения, зараженности объекта болезнями, погодных условий, а также экологической ситуации, складывающейся из многих

факторов. Поэтому подбор оптимальных способов и стерилизующих препаратов для получения асептических растений является необходимым этапом в разработке регламента клонального микроразмножения. Как правило, стандартная процедура, применяемая для стерилизации растительного материала плодовых культур при введении их *in vitro*, включает использование растворов ртути содержащих веществ – сулемы и диацета или хлорсодержащие препараты, в основном применяемые в быту в качестве отбеливателей. Однако концентрация и время обработки рознятся в зависимости от объекта введения в асептическую культуру.

Проведено изучение эффективности использования различных стерилизующих веществ для подавления роста сапрофитной и патогенной микрофлоры при введении в асептическую культуру апексов побегов. Экспланты изолировали, стерилизовали и высаживали на искусственные питательные среды. Для выявления эффективных стерилизующих препаратов испытывали в различных концентрациях и экспозициях $HgCl_2$, отбеливатель, содержащий гипохлорит натрия – «Domestos» и 3% перекись водорода (H_2O_2). Эксперименты проводили с терминальными побегами сортов яблони: Голден Делишес, Восход и Максат. Результаты стерилизации сегментов побегов от заражения микрофлорой приведены на рисунке 1 (рисунок 1).

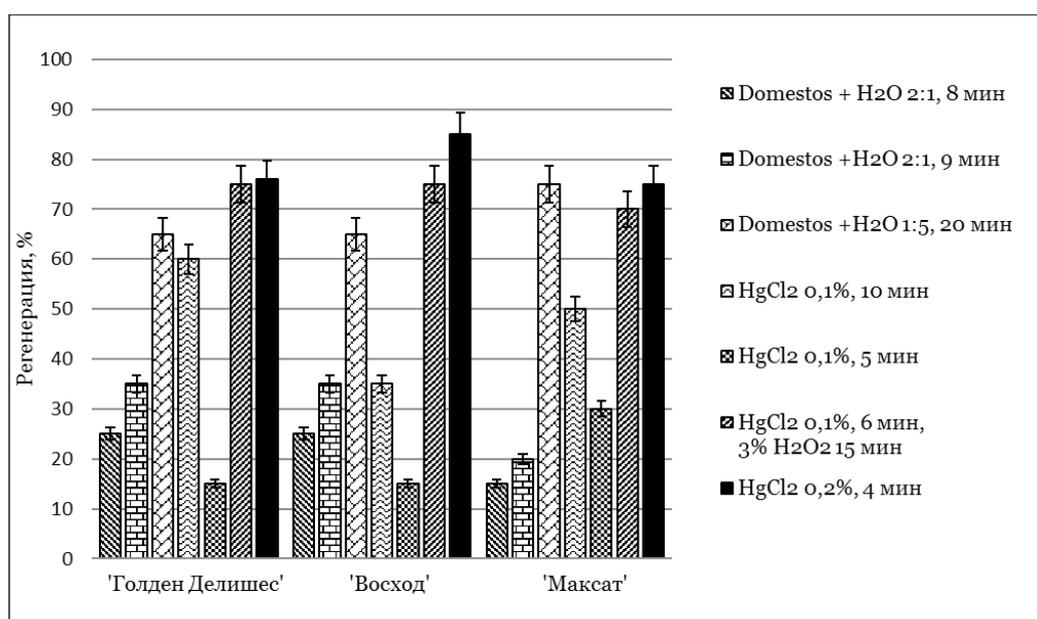


Рисунок 1 – Результаты стерилизации апексов яблони от сапрофитной и патогенной микрофлоры различными препаратами

Проведённые эксперименты показали, что побеги яблони эффективно стерилизовать 0,2% HgCl_2 в экспозиции 4 мин. В этом случае количество эксплантов способных регенерировать составляет у сорта Голден Делишес 76%, у сорта Восход 85%, у сорта Максат 75%. Хороший эффект был получен при сочетании стерилизации HgCl_2 0,1% (6 мин) с последующей обработкой 3% H_2O_2 (4 мин). Число живых побегов составило 75%, 75% и 70% соответственно. Стерилизация «Domestos» также успешна в разведении с H_2O 1:5 при экспозиции 20 мин, при этом обеззараживается от 65 до 75% побегов.

Реакция сортов на стерилизацию различными реагентами не одинакова. Так, например стерилизация HgCl_2 0,2% в экспозиции 4 мин приводила к некрозу нескольких побегов сорта Голден Делишес, а у сортов Восход и Максат некроза не наблюдалось, однако число побегов, зараженных бактериями и грибами, было выше. Подобные различия наблюдались и в пределах одного сорта, одни побеги погибали или были заражены, а другие после тех же манипуляций регенерировали.

В работах многих ученых также рекомендуется применять для стерилизации от микрофлоры HgCl_2 в различной концентрации или бытовые отбеливатели, содержащие хлор [11-14]. Другие исследователи рекомендуют менее опасные средства $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, HgCl_2 и H_2O_2 [15], дезинфицирующее средство септодор-форте [16], гипохлорит натрия и фосфопаг [17] или ступенчатую стерилизацию: 70%-ный этанол, 1%-ный раствор Thimerosal и 0,08% раствор нитрата серебра [18].

Особенностью введения культуры яблони в асептическую культуру *in vitro* является окисление фенольных соединений, выделяемых в питательную среду при отчленении экспланта, в результате чего микропобег погибает. В связи с этим оптимизировали состав питательных сред. Основой являлась не агаризованная среда МС с различными добавками, снижающими окислительные процессы (поливинилпирролидон, витамин С, NaFeEDTA) и регуляторами роста (БАП, ИМК, ГК). В течение 7 суток каждые 24 часа растения пересаживали на свежие среды (таблица 1, рисунок 2а).

Таблица 1 – Влияние состава питательных сред на введение в культуру *in vitro* эксплантов яблони (среднее по сортам Голден Делишес, Восход, Максат)

Варианты питательных сред и концентрации фитогормонов, мг/л	Высажено побегов, шт.	Некроз побегов, шт.	Регенерировано		Ошибка среднего показателя (\pm)
			шт.	%	
МС, 0,5 БАП; 0,2 ИМК	370	356	14	3,8	0,67
МС, $\text{NaFeEDTA} \times 3$; 15 витамин С; 250 поливинилпирролидон; 0,5БАП; 0,2 ИМК	150	108	42	28,0	1,53
МС, $\text{NaFeEDTA} \times 4$; 20 витамин С; 500 поливинилпирролидон; 4глицин; 0,5 БАП; 0,2 ИМК; 0,1 ГК	120	36	84	70	1,15
МС, $\text{NaFeEDTA} \times 2$; 1,5 витамин С; 250 поливинилпирролидон; 2 глицин; 0,5 БАП; 0,1ИМК	120	25	95	79	0,33

Среда МС, $\text{NaFeEDTA} \times 2$, 1,5 мг/л витамина С, 250 мг/л поливинилпирролидона, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК была лучшей для изоляции эксплантов на питательную среду, получено 79% регенерирующих побегов яблони.

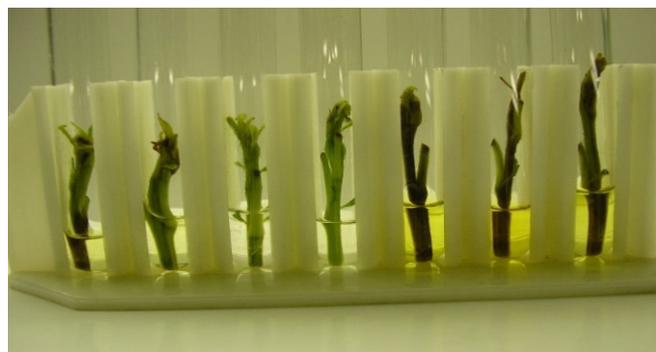
В ряде публикаций также сообщается, что на этапе введения *in vitro* микропобеги яблони часто подвергаются фенольному окислению, которое приводит не только к потемнению питательной среды и тканей, но и ингибированию морфогене-

за. Для решения такой проблемы ученые применяли антиоксиданты – аскорбиновую (АК) и лимонную кислоты (ЛК), поливинилпирролидон (ПВП) и их комбинации АК+ЛК+ активированный уголь (АУ). Однако, использование антиоксидантов не приводило к полному исключению окисления фенолов, а только снизило их появление и способствовало образованию 6,2-38,9% микрочеренков, пригодных для дальнейшего укоренения, и для введения в культуру рекомендуют БАП в концентрации 0,5мг/л с добавлени-

ем антиоксидантов [13, 19-20]. М. Laimer и др. (1988) предложили на этапе введения в культуру при микроразмножении яблони использовать 2,0 мг/л БАП совместно с НУК 0,4 мг/л [21].

В противоположность подобного утверждения результаты наших исследований показали,

что одновременное применения ряда антиоксидантов приводит к значительному снижению окисления фенольных соединений (выживаемость 79%). Возможно, такой результат был достигнут благодаря ежедневной пересадке побегов на свежие среды.



а



б

Рисунок 2 – Введение и клональное микроразмножение яблони ‘Максат’ *in vitro*:

а) введение эксплантов в асептическую культуру (не агаризованная среда МС, NaFeEDTA × 2, 1,5 мг/л витамин С, 250 мг/л поливинилпирролидон, 2 мг/л глицин, 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК; б) клонирование на искусственной питательной среде (МС, 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК)

Тестирование на наличие грибных и бактериальных инфекций, отбраковка заражённых

Кроме сапрофитной микрофлоры в растениях может развиваться патогенная, которая в отличие от сапрофитной не всегда погибает при стерилизации. При пассаже таких растений на питательную среду, со временем патогенная микрофлора начнет развиваться и может погубить растения. Во избежание этого, во время введения растений в культуру *in vitro*, целесообразно проверять микробеги на заражение скрытой микрофлорой на провокационной VISS среде, это эффективный способ диагностики на наличие патогенной и сапрофитной микрофлоры. Провокационная среда специализирована для активного развития бактерий и грибов, в течение 1-3 недель в случае заражения появляется характерный рост микрофлоры. Поражённые растения, растущие на среде для размножения, отбраковываются.

Базальная часть побегов всех сортов яблони прошедших стерилизацию от сапрофитной микрофлоры была высажена на VISS среду. Результаты тестирования показали эффективность применённого метода для выявления латентного заражения побегов. В результате проверки зара-

жённые растения от 0 до 80 % в зависимости от сорта были отбракованы. Свободные от микрофлоры от 20 до 100% пассированы на среды для дальнейшего размножения.

Клональное микроразмножение

После успешного прохождения начального этапа введения эксплантов в асептическую культуру, провели эксперименты по клональному микроразмножению. Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко (1983) выделили два принципиально различных типа клонального микроразмножения один из них активация уже существующих в растении меристем, находящихся в апексе стебля, пазушных и спящих почках, которые можно использовать в качестве экспланта [22-23]. Для активации роста и мультипликации применяют различные стимуляторы роста. Часто используются фитогормоны и их аналоги: цитокинины (зеатин, синтетические – 6-бензиламинопурин (БАП), 6-фурфураминопурин (кинетин), 2-изо-пентениладенин (2ip)), ауксины (индолил-3-уксусная кислота (ИУК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), α-нафтил-уксусная кислота (α-НУК)), гиббереллины (ГК), витамины (аскорбиновая кислота, пиридоксин НС I, никотиновая кислота, тиамин НС I и др.). Ряд авторов счита-

ют, что целесообразно применять цитокинины и ауксины совместно. D. Dunstan et al. выявил, что на среде МС, содержащей 1,15 мг/л БАП и 0,15 – 0,20 мг/л ИМК можно получить высококачественные побеги подвоя яблони М4 [24]. Lane и McDougald (1982) изучали размножение побегов четырех сортов яблони («М.27», «М.9», «М.26», Macspur) и обнаружили, что культурные сорта различаются по их реакции на концентрацию цитокининов, 6-бензоаминопурина (БАП) в среде: оптимальные уровни для развития максимального количества побегов были разными для каждого сорта (5 мкм для «М.26» и «Маскура» и 10 мкм для «М.27» и «М.9») [25]. Пазушные почки сорта Douce de Djerba *in vitro* прорастали до 80%, и средняя длина побега достигала 2,8 см при 1.0mg/L⁻¹ ВАР, при 1.0mg/L⁻¹ ВАР + 0,5mg/L⁻¹ ИВА, прорастание составило 85%, а длина побегов 3,2 см. [13]. Матушкина и Пронина изучив

воздействия БАП, кинетина, тиадазурана и зеатина на пролиферацию сортов и подвоев яблони, выявили, что при высоких концентрациях БАП (2,0 мг/л) коэффициент размножения бывает очень низким, даже равен нулю [19-20]. Несколькими авторами описана генотип-зависимость размножения микропобегов яблони [26-28].

В связи с разноречивостью информации и слабым коэффициентом размножения при применении рекомендованных регуляторов роста в клонировании *in vitro* казахстанских сортов, нами проведён ряд экспериментов по подбору гормонального состава питательных сред оптимальных для размножения в искусственных условиях. Минеральной основой являлась среда МС, испытывали регуляторы роста БАП, ИМК и ГК в различных концентрациях. Эксперименты проводили с сортом Грушовка Верненская и дикорастущей формой ТМ-6 (рисунок 3).

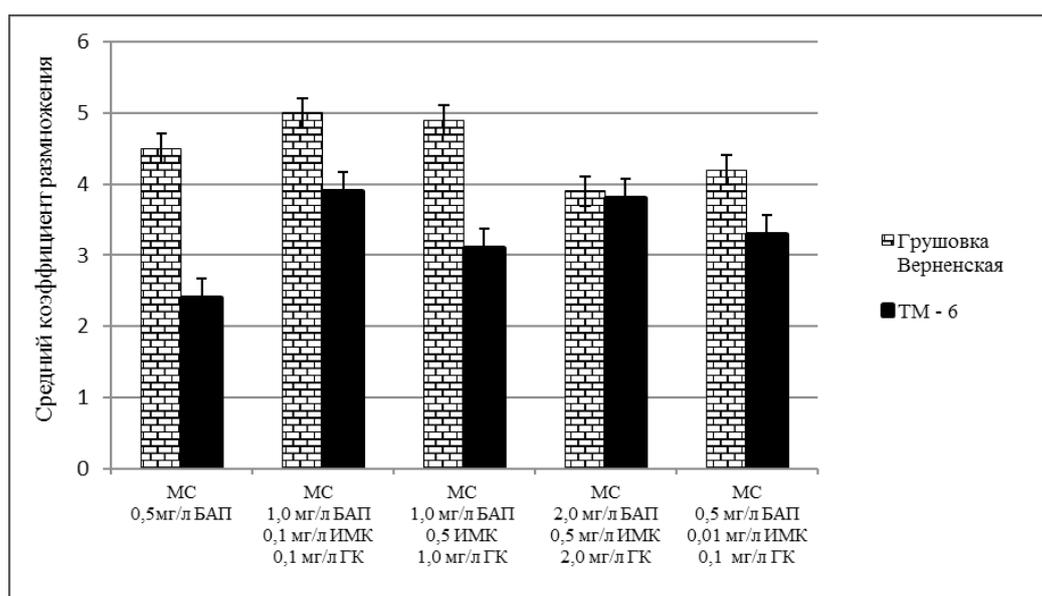


Рисунок 3 – Влияние гормонального состава среды на клональное микроразмножение яблони сорта Грушовка Верненская и дикорастущей формы ТМ-6

В результате определена оптимальная среда для клонального микроразмножения яблони: минеральная основа МС, содержащая: 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК. Средний коэффициент размножения двух сортов составил 4,45 (рисунок 3).

Впоследствии на оптимизированной нами среде успешно размножено 36 сортов и 8 дикорастущих форм яблони: сорта отечественной селекции Дамира, Бельфлёр Алматинский, Мак-

сат, Заря Алатау, Восход, Анель, Даналык, Салтанат, Талгарское, Байтерек, Карлыгаш, Заман, Тюльпан, Егемен, Заилийское, Казахское Юбилейное, Нургуль, Рахат, Румянка Алматинская, Синап Алматинский, Улан; районированные интродуцированные сорта: Голден Делишес, Суйслеппер, Мутсу и Рояль Ред Делишес, Агат, Айдаред, Горлицвет, Кандиль Синап, Старкримсон; стародавние сорта: Апорт и Форма Апорта 5/18, Форма Апорта 5/3, Форма Апорта 5/7, Пеструш-

ка, Грушовка Верненская; дикорастущие формы *M. sieversii*: № 28, № 36, № 43, №4, ТА-28, ТП-24, ТП-27, ТС-15, ТМ-6.

Следует отметить, что некоторые сорта имели более высокий коэффициент размножения чем сорта участвующие в эксперименте, что подтвердило правильность подобранной среды – сорта Анель (K_p 13,2), Голден Делишес (K_p 9,5), Даналык (K_p 7,9), Максат (K_p 7,4), Восход (K_p 7,2).

Результаты наших экспериментов подкреплены литературными данными, где утверждается, что для размножения *in vitro* многих генотипов яблони необходима оптимизация лабораторных условий выращивания [17, 20], а подбор регуляторов роста являются одним из ключевых моментов клонального микроразмножения [28-29].

Заключение

В результате проведённых исследований разработаны приемы получения асептических побегов яблони *in vitro* (стерилизация $HgCl_2$ в экспозиции 4 мин. или Domestos» с H_2O 1:5 – 20 мин, проверка на VISS среде). Подобран гормональный состав питательной среды для изоляции, стимулирующий регенерационные процессы

(минеральная основа МС без агара, удвоенное содержание NaFeEDTA, витамин С – 1,5 мг/л, поливинилпирралидон – 250 мг/л, глицин – 2мг/л, БАП – 0,5 мг/л, ИМК – 0,1 мг/л). Для микроклонального размножения яблони определена оптимальная среда МС, содержащая: 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК.

На основе полученных результатов экспериментов, приведённых выше в культуру *in vitro* введены и размножены 36 сортов и 9 дикорастущих форм яблони.

Результаты исследований могут успешно использоваться в научных и производственных лабораториях по клональному микроразмножению, а также в создании криобанка и хладокolleкции гермоплазмы яблони.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке грантового финансирования проекта AP05132995 «Совершенствование биотехнологического регламента клонального микроразмножения яблони с применением современного программного обеспечения для пополнения генофонда и внедрения в агропроизводство элитных саженцев» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Jones O. P. Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots //Nature. – 1967. – Т. 215. – №. 5109. – P. 1514.
- 2 Elliott R. F. Axenic culture of shoot apices of apple //New Zealand Journal of Botany. – 1972. – Т. 10. – №. 2. – С. 254-258.
- 3 Walkey D. G. Production of apple plantlets from axillary-bud meristems //Canadian Journal of Plant Science. – 1972. – Т. 52. – №. 6. – P. 1085-1087.
- 4 Marin J. A., Jones O. P., Hadlow W. C. C. Micropropagation of columnar apple trees //Journal of Horticultural Science. – 1993. – Т. 68. – №. 2. – P. 289-297.
- 5 Noiton D., Vine J. H., Mullins M. G. Effects of serial subculture in vitro on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jona-than' apple //Plant growth regulation. – 1992. – Т. 11. – №. 4. – P. 377-383.
- 6 Webster C. A., Jones O. P. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple //Journal of horticultural science. – 1991. – Т. 66. – №. 1. – P. 1-6.
- 7 Welander M. In vitro rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets //Physiologia Plantarum. – 1983. – Т. 58. – №. 3. – P. 231-238.
- 8 Yepes L. M., Aldwinckle H. S. Micropropagation of thirteen Malus cultivars and root-stocks, and effect of antibiotics on proliferation //Plant Growth Regulation. – 1994. – Т. 15. – №. 1. – P. 55-67.
- 9 Zimmerman R. H. Propagation of fruit, nut, and vegetable cropsoverview //Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. – Springer, Dordrecht, 1986. – P. 183-200.
- 10 Viss P. R., Brooks E. M., Driver J. A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 1991. – Т. 27. – №. 1. – P. 42-42.
- 11 Волгина М.А., Карычев К.Г., Ковальчук И.Ю. Микроклональное размножение яблони и груши // Научные достижения в биотехнологии, виноградарстве и ягодоводстве. Сб. трудов КазНИИ плодоводства и виноградарства.- Алматы.- 1997.- Т. 13. – С.11-15.
- 12 Ромаданова Н.В., Серадж Н.А., Нурманов М.М., Карашолакова Л.Н. Введение в культуру *in vitro* дикорастущей яблони *Malus Sieversii*. Издатель, нәтижелер – Исследования, результаты. № 3 (75) 2017. Стр. 103-110.
- 13 Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., & Ferchichi, A. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds //Acta Botanica Gallica. – 2010. – Т. 157. – №. 3. – P. 513-524.

14 Турдиев Т.Т., Ковальчук И.Ю., Успанова Г.К., Чуканова Н.И., Фролов С.Н. Оптимизация клонального микроразмножения для сохранения генофонда растений груши // Вестник КазНУ, Серия биологическая. – 2015. – № 3. – С. 356-362.

15 Halim, M. A., Alam, M. F., Rahman, M. H., Hossain, M. B., & Uddin, M. B. Sterilization process for *In vitro* regeneration of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) // International Journal of business, social and scientific research. – 2016. – Т. 4. – №. 4. – P. 320-323.

16 Красноштан Т. В. Экспозиція стерилізації та підбір стерилізатора для введення мікроживців смородини золотистої (*Ribes aureum* Pursh.) *in vitro* // Агробіологія. – 2013. – №. 10. – С. 134-136.

17 Беседина Е. Н., Бунцевич Л. Л. Усовершенствования технологии клонального микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 111. – с. 1-19.

18 Иванова Н. Н., Хохлов С. Ю., Митрофанова И. В. Особенности введения эксплантов хурмы восточной в условия *in vitro* // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2016. – №. 119. – с. 44-51.

19 Матушкина О. В., Пронина И. Н. Особенности воздействия экзогенных цитокининов и их производных на регенерацию яблони и груши *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – №. 8. Стр. 34-35.

20 Матушкина О. В., Пронина И. Н. Размножение яблони и груши *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №. 2. Стр. 15-17.

21 Laimer M., A. da Camara Machado, V. Hanzer, H. Weiss, D. Mattanovich, G. Himmler, H. Katinger *In vitro* Kultur zur Virusfreimachung alter Apfelsorten // Mitt. Klosterneuburg, 1988. – v. 38, №6. – P. 247-249

22 Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.

23 Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Принципы микроклонального размножения растений на примере герберы // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1982. – №. 1. – С. 126-130.

24 Dunstan D. I., Turner K. E., Lazaroff W. R. Propagation *in vitro* of the apple rootstock M4: effect of phytohormones on shoot quality // Plant cell, tissue and organ culture. – 1985. – Т. 4. – №. 1. – P. 55-60.

25 Lane W. D., McDougald J. M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin // Canadian Journal of Plant Science. – 1982. – Т. 62. – №. 3. – P. 689-694.

26 Kovalchuk, I., Lyudvikova, Y., Volgina, M., & Reed, B. M. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2009. – Т. 96. – №. 2. – P. 127-136.

27 Dobránszky, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., & Lazányi, J. Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions // International Journal of Horticultural Science. – 2000a. – Т. 6. – №. 4. – P. 76-78.

28 Dobránszky, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., & Lazányi, J. *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin // International Journal of Horticultural Science. – 2000b. – Т. 6. – №. 1. – P. 36-39.

29 Ковальчук И.Ю. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур-продуцентов биологически активных веществ // Ж. Биотехнология. Теория и практика. – 2002. – №2. – С. 80 – 82.

References

- 1 Jones, O. P. (1967). Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots. *Nature*, 215(5109), 1514.
- 2 Elliott, R. F. (1972). Axenic culture of shoot apices of apple. *New Zealand Journal of Botany*, 10(2), 254-258.
- 3 Walkey, D. G. (1972). Production of apple plantlets from axillary-bud meristems. *Canadian Journal of Plant Science*, 52(6), 1085-1087.
- 4 Marin, J. A., Jones, O. P., & Hadlow, W. C. C. (1993). Micropropagation of columnar apple trees. *Journal of Horticultural Science*, 68(2), 289-297.
- 5 Noiton D., Vine J. H., Mullins M. G. Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan' apple. *Plant growth regulation*. – 1992. – Т. 11. – №. 4. – P. 377-383.
- 6 Webster C. A., Jones O. P. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. *Journal of horticultural science*. – 1991. – Т. 66. – №. 1. – P. 1-6.
- 7 Welander M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*. – 1983. – Т. 58. – №. 3. – P. 231-238.
- 8 Yepes L. M., Aldwinckle H. S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*. – 1994. – Т. 15. – №. 1. – P. 55-67.
- 9 Zimmerman R. H. Propagation of fruit, nut, and vegetable crops overview. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. – Springer, Dordrecht, 1986. – P. 183-200.
- 10 Viss P. R., Brooks E. M., Driver J. A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. – 1991. – Т. 27. – №. 1. – P. 42-42.
- 11 Volgina M.A., Karychev K.G., Kovalchuk I.Yu. (1997) Microclonal propagation of apple and pear. *Scientific advances in biotechnology, viticulture and berry*. Collection of works of the Kazakh Research Institute of Horticulture and Viticulture, (13), p.11-15.
- 12 Romadanova N.V., Seraj N.A., Nurmanov M.M., Karasholakova L.N. (2017) Introduction to *in vitro* culture of wild apple *Malus sieversii*. *Research, Results*, 3(75), p. 103-110.

- 13 Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., & Ferchichi, A. (2010). Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 513-524.
- 14 Turdiev T.T., Kovalchuk I.Yu., Uspanova G.K., Chukanova N.I., Frolov S.N. (2015) Optimization of clonal micropropagation to preserve the gene pool of pear plants. *Vestnik KazNU, Biological Series*, № 3, p. 356-362.
- 15 Halim, M. A., Alam, M. F., Rahman, M. H., Hossain, M. B., & Uddin, M. B. (2016). Sterilization process for In vitro regeneration of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *International Journal of business, social and scientific research*, 4(4), 320-323.
- 16 Krasnostan TV. (2013) Exposition of sterilization and selection of sterilizer for introduction of microorganisms of currant golden (*Ribes aureum* Pursh.) In vitro. *Agrobiologiya*, 10, p.134-136.
- 17 Besedina Ye.N., Buntsevich L.L. (2015) Improvements in the technology of clonal micropropagation of apple rootstocks at the stage of introduction to in vitro culture. *Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University*, №.111, p. 1-19.
- 18 Ivanova N. N., Khokhlov S. Yu., Mitrofanova I. V. (2016). Features of the introduction of explants of persimmon eastern in vitro conditions. *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden*, (119), p. 44-51.
- 19 Matushkina O.V., Pronina I.N. (2010) Features of the impact of exogenous cytokinins and their derivatives on the regeneration of apple and pear in vitro. *Achievements of science and technology of the AIC*, №8, p. 34-35
- 20 Matushkina O.V., Pronina I.N. (2009) Reproduction of apple and pear in vitro. *Achievements of science and technology of the AIC*, №2, p. 15-17.
- 21 Laimer M., A. da Camara Machado, V. Hanzer, H. Weiss, D. Mattanovich, G. Himmler, H. (1988). Katinger In vitro Kultur zur Virusfreimachung alter Apfelsorten. *Mitt. Klosterneuburg.* – v. 38, №6. – p. 247-249
- 22 Kataeva N.V., Butenko R.G. (1983) Clonal micropropagation of plants. *Science*, 96 p.
- 23 Kataeva N.V., Butenko R.G. (1982) Principles of microclonal propagation of plants on the example of a gerbera. *Izv. Academy of Sciences of the USSR. Biology*, № 1, p.126-130.
- 24 Dunstan, D. I., Turner, K. E., & Lazaroff, W. R. (1985). Propagation in vitro of the apple rootstock M4: effect of phytohormones on shoot quality. *Plant cell, tissue and organ culture*, 4(1), 55-60.
- 25 Lane, W. D., & McDougald, J. M. (1982). Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. *Canadian Journal of Plant Science*, 62(3), 689-694.
- 26 Kovalchuk, I., Lyudvikova, Y., Volgina, M., & Reed, B. M. (2009). Medium, container and genotype all influence in vitro cold storage of apple germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(2), 127-136.
- 27 Dobránszky, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., & Lazányi, J. (2000b). Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions. *International Journal of Horticultural Science*, 6(4), 76-78.
- 28 Dobránszky, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., & Lazányi, J. (2000). In vitro shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. *International Journal of Horticultural Science*, 6(1), 36-39.
- 29 Kovalchuk I.Yu. (2002) Clonal micropropagation of fruit and berry crops-producers of biologically active substances. *Biotechnology. Theory and Practice*, №2, p. 80-82.