

УДК 581.4; 635.9

¹Ж.С. Кожебаева*, ²В.К. Мурсалиева¹ Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан,

*e-mail: kozhjan@mail.ru

Оптимизация условий микроклонального размножения яблони Сиверса

Рассматриваются особенности микроклонального размножения *in vitro* яблони Сиверса *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. Проведена оптимизация состава питательной среды на этапах собственно микроклонирования и индукции ризогенеза у микропобегов яблони Сиверса с использованием растительных экстрактов кровохлебки лекарственной *Sanquisorba officinalis* L.

Ключевые слова: микроклональное размножение, *in vitro*, *Malus sieversii*, *Sanquisorba officinalis* L.

Ж.С. Кожебаева, В.К. Мурсалиева

Сиверс алмасын микроклондық көбейту жағдайларын оңтайландыру

Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде Сиверс алмасының *in vitro* микроклондық көбейту жағдайы оңтайландырылды. *S. officinalis* тамыршасынан бөліп алынған спирттік экстрактта тамыр түзу процесін синергиялық стимулдейтін эффектісі анықталды. *S. officinalis* тамыршасынан алынған фитоэкстрактың микроөркеннің тамырлануына 100%-ға дейін оңтайлы индуцирлейтін әсері 1 мг/л экстракт пен 0,5 мг/л ИМК қатынасында байқалды.

Түйін сөздер: микроклондық көбейту, *in vitro*, *Malus sieversii*, *Sanquisorba officinalis* L.

Zh.S. Kozhebayeva, V.K. Mursaliyeva

Optimization the conditions of micropropagation of apple Sievers

The conditions for micropropagation of *Malus sieversii* were optimized. Synergistic stimulatory effect of alcoholic extracts isolated from the rhizomes of *S. officinalis* on rooting were revealed. Optimal inducing effect in combination of 1 mg / l and 0.5 mg / L IBA has been established..

Keywords: micropropagation, *in vitro*, *Malus sieversii*, *Sanquisorba officinalis* L.

Дикие формы яблони Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) широко используются в качестве подвоя, источника ценных генов для сохранения от вырождения культурных сортов и создания новых форм и сортов [1].

В связи с этим размножение ценных форм яблони Сиверса, являющейся основной лесообразующей породой в плодолиственной зоне Заилийского и Джунгарского Алатау, имеет глобальное значение для всего человечества.

В качестве альтернативного способа для сохранения, ускоренного размножения и освобождения от патогенной микрофлоры растительного материала во всем мире успешно применяется метод культуры клеток и тканей *in vitro*, на основе которого создаются производственные лаборатории по выпуску элитного посадочного материала для многих плодово-ягодных и декоративных культур [2, 3].

Известно, что на способность изолированных тканей к морфогенезу влияет видовая принадлежность исходного растения, его регенерационный потенциал. В связи с этим важно изучить видовые различия растений по способности к морфогенезу *in vitro* и на основе их оптимизировать специфические приемы микроклонального размножения яблоневых пород.

В Институте биологии и биотехнологии растений КН МОН РК разработан лабораторный регламент получения адаптированных к условиям почвенного грунта микроклон яблонь через культуру *in vitro*, который можно использовать для реинтродукции в места естественного произрастания [4].

Одним из основных сдерживающим фактором для внедрения технологии в практику пловодческих хозяйств и питомников является низкий коэффициент микроразмножения и невысокий выход укорененных побегов. Необходима дальнейшая

оптимизация условий культивирования *in vitro* для сокращения сроков получения полноценных регенерантов, повышения коэффициента размножения и существенного снижения себестоимости питательной среды.

В последние годы в исследованиях показана высокая ростстимулирующая активность целого ряда природных соединений (тритерпеноидов, фенолов, гидрооксикоричных кислот, некоторых витаминов, аминокислот и др.), которые наряду с фитогормонами целесообразно использовать для создания экологически безопасных регуляторов роста [5,6].

Целью исследований являлась оптимизация состава стандартной питательной среды МС для повышения коэффициента размножения и корнеобразования у микропобегов яблони Сиверса с использованием растительных экстрактов из надземной части растений и корневищ *Sanquisorba officinalis* L.

Материалы и методы

Исходным материалом для введения *in vitro* служили однолетние побеги, срезанные с 6-8 летних деревьев яблони Сиверса из коллекции АО «Лесной питомник». В качестве эксплантов для культивирования на искусственных питательных средах использовали микрочеренки с апикальными и пазушными почками.

Методика культивирования эксплантов, приготовление питательных сред проводилось стандартным методом [7]. Для культивирования использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). В качестве регуляторов роста в питательную среду

вносили ауксины: индолилмасляную кислоту (ИМК), индолилуксусную кислоту (ИУК); цитокинины: 6-бензиламинопурин (БАП), кинетин в различных концентрациях, а также суммарные экстракты из надземной части и корневищ кровохлебки лекарственной.

Коэффициент размножения (K_r) подсчитывали делением общего количества образующихся адвентивных побегов в варианте на число первичных эксплантов или пассированных микропобегов.

Суммарные экстракты из растительного сырья кровохлебки лекарственной получали способом последовательного настаивания в этиловом спирте и дистиллированной воде с последующей перегонкой на роторном испарителе. Полученные экстракты, содержащие комплекс биологически активных веществ вносили в основную среду Мурасиге и Скуга ($\frac{1}{2}$ МС) в концентрациях 1 мг/л и 50 мг/л в сочетании с 0,5 мг/л ИМК. Результаты оценивались через 30 дней культивирования по проценту корнеобразования у пробирочных микропобегов. Контроль – среда $\frac{1}{2}$ МС с добавлением ауксина индолилмасляной кислотой (ИМК) в концентрации 0,5 мг/л.

Результаты и их обсуждение

Важным этапом микроклонального размножения растений является отбор экспланта, введение его в условия *in vitro* и получение асептической культуры. Трудности культивирования микрочеренков яблони связано с выделением ими в питательную среду фенольных соединений, продукты, окисления которых губительно воздействуют на культивируемую ткань.

Таблица – Влияние гормонального состава среды на микроразмножение яблони Сиверса

№	Гормональный состав среды (мг/л)	Количество первичных эксплантов	Количество побегов в зависимости от пассажа			Коэффициент размножения K_r
			I	II	III	
1	БАП – 2 ИУК – 0,1	14	8	13	35	2,50
2	БАП – 1 ИМК – 0,01	8	8	8	27	3,38
3	Кинетин – 1 ИМК – 0,01	7	7	12	20	2,85

В наших экспериментах эффективным для снятия негативного влияния вторичных метаболитов, оказалось культивирование первичных эксплантов на $\frac{1}{2}$ МС среде с

повышенным уровнем аскорбиновой кислоты (1 мг/л) и их пассирование на свежие среды через каждые 3-4 дня при появлении первых признаков потемнения питательной среды.

Выявлено, что на индукцию роста пазушных почек и закладку дополнительных почек существенное влияние оказывает гормональный состав среды (таблица).

Из данных приведенных в таблице видно, что количество вновь сформированных побегов было выше при добавлении БАП в качестве цитокинина. Наименьший K_r отмечен при сочетании БАП и ИУК. Комбинирование кинетина и ИМК незначительно повышало интенсивность размножения. В целом, за три пассажа коэффициент размножения варьировал от 2,5 до 3,4 в зависимости от гормонального состава среды.

Следующий этап работы оптимизация состава питательной среды для повышения корнеобразования у полученных микропобегов яблони с использованием растительных экстрактов.

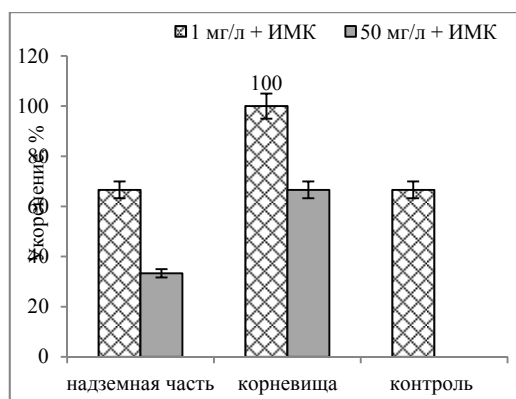


Рисунок – Влияние экстрактов, выделенных из надземной части и корневищ *S. officinalis* на индукцию ризогенеза *in vitro* яблони Сиверса

В проведенных нами ранее исследованиях получены экспериментальные данные по влиянию отдельных фитоэкстрактов на

индукцию ризогенеза в модельных системах каллусной ткани однодольных и двудольных растений. Выявлено стимулирующее действие экстрактов на микрочеренках трудноукореняемых сортов роз в культуре *in vitro* [8,9].

Результаты настоящих исследований показали, что растительные экстракты оказывают существенное влияние на индукцию ризогенеза *in vitro* у микропобегов яблони Сиверса и стимулирующая активность экстрактов зависит от их концентрации в питательной среде и от части растения – источника экстракта (рисунок).

В контроле с ИМК укореняемость микропобегов составила 66,6%. При дополнительном внесении 50 мг/л экстракта из надземной части *S. officinalis* в стандартную среду с 0,5 мг/л ИМК укореняемость микропобегов не превышала 33,3 %, а при внесении низкой дозы 1 мг/л - стимулировало корнеобразование на уровне контроля (66,6%). Значительное усиление корнеобразования отмечено при дополнительном внесении в стандартную среду экстрактов из корневищ *S. officinalis* в концентрации 1 мг/л. Укореняемость микропобегов составила 150% по сравнению с контролем с 0,5 мг/л ИМК.

В результате проведенной работы оптимизированы условия микроклонального размножения яблони Сиверса *in vitro*. Выявлен синергический стимулирующий эффект на корнеобразование *in vitro* у спиртовых экстрактов, выделенных из корневищ *S. officinalis*. Оптимальное индуцирующее действие фитоэкстрактов из корневищ *S. officinalis* на укоренение микропобегов до 100 % отмечается при сочетании 1 мг/л экстракта и 0,5 мг/л ИМК.

Литература

- 1 Джангалиев А.Д. Дикая яблоня Казахстана Алматы, 1977. – 279 с.
- 2 Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Труды Никитского ботанического сада. – 2009. – Т. 131. – С. 22-27.
- 3 Колбина Л. Сады из пробирки // Эксперт Урал. 2012. №45 (533). <http://expert.ru/ural/2012/45/sadyi-iz-probirki/>
- 4 Жумабеков Е.Ж., Вечёрко Н.А., Ромаданова Н.В. Клональное микроразмножение яблони Сиверса. Лабораторный регламент. – Алматы, 2010. - 25 с.
- 5 Патент 2111652 Российской Федерации, МПК⁶ А01Н4/00. Питательная среда для микроклонального размножения подвоев яблони / Фардинова И.М.; заявитель и патентообладатель Горский государственный аграрный университет. №96116869/13; заявл. 09.08.1996; <http://www.findpatent.ru/patent/211/2111652.html>.

-
- 6 Патент 2309591 Российской Федерации МПК 51 AON65/00, A001G1/00. Способ обработки зеленых черенков садовых культур / Упадышев М.Т., Туть Е.А.; заявитель и патентообладатель Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии. № 2006107407/15; заявл. 13.03.2006; <http://www.findpatent.ru/patent/230/2309591.html>.
- 7 Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 487 с.
- 8 Инновационный патент № 24973. Способ повышения выхода биомассы при культивировании каллусов / Мамонов Л.К., Мурсалиева В.К., Пономарев Б.Н., Завадский В.А., Сатыбалдиева Д.Н. Зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РК 17.11.2011 г. Опубликовано 15.12.2011. - Бюл. № 12.
- 9 Mursalieva V.K., Nam S.V. Influence of hydrolysable tannins on rhizogenesis rose *in vitro* // 1st International Symposium on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties. – Turkey, 2011. – P.132.