

УДК 674.031.734.2

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЯБЛОНИ

Елена Викторовна Григорьева

аспирант

rigorieva-elena1615@yandex.ru

Алексей Андреевич Привалов

аспирант

asher_satton@mail.ru

Роман Валериевич Папихин

кандидат сельскохозяйственных наук, начальник научного центра

биотехнологий и селекции

parom10@mail.ru

Ирина Александровна Шамрина

студент

all2585@mail.ru

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. В статье рассматривается вопрос клонального микроразмножения растений рода *Malus*. На основе анализа литературы, показано, что некоторые формы яблони обладают низким коэффициентом размножения. Приводятся сведения о способах стимуляции микроразмножения на разных этапах культивирования.

Ключевые слова: яблоня, *Malus*, клональное микроразмножение, укоренение, регуляторы роста.

Яблоня домашняя (*Malus domestica* Bork) является наиболее распространённой плодовой культурой в мире, ее культивируют как севере, так и на юге умеренной зоны.

Сорта яблони размножают путём прививки или окулировки на подвойные формы, которые, как и сорта так же получают путём продолжительного селекционного отбора. Это связано в первую очередь с тем, что, как правило, коммерческие сорта невозможно размножить обычными способами: зелёным черенкованием или отводками.

Применение подвоев в садоводстве решает множество проблем, во-первых, их можно относительно легко размножить, во-вторых, подвойные формы приводят к повышению технологичности в саду, например, контролю силы роста деревьев, ускоренному плодоношению, устойчивости к болезням, передающимся через почву и др. [2-4, 6].

В начале разработки методов клонального микроразмножения считалось, что обеспечить быстрое размножение культивирования растительных тканей *in vitro* можно только у травянистых растений. Данные методы считались трудно применимыми к древесным культурам, в связи с относительно продолжительным этапом развития микрорастений. Однако в некоторых работах 20 века данные тезисы полностью отвергались [15].

Активные исследования в этом направлении привели к разработке эффективных способов микроразмножения растений рода *Malus*, в том числе коммерческих сортов и подвоев [9].

Культура микропобегов с пролиферацией пазушных побегов является общепринятым методом размножения *in vitro* для сохранения генетической целостности клона.

Такие методы широко применяются к растениям рода *Malus* с середины прошлого века, кроме этого, активно используются методы регенерации адвентивных побегов или зародышей из эксплантатов и каллуса. При этом некоторые генотипы обладают хорошей способностью к калусообразованию и регенерации адвентивных побегов. Пример получения такого активного

морфогенетического ответа был продемонстрирован на межвидовых гибридах *M. sieboldii* при стимулировании эксплантов физическими и химическими факторами воздействия [1, 10].

Однако адвентивная регенерация может приводить к генетическим вариантам или соматональным вариантам. Они нежелательны для производства, но могут быть использованы для селекционной работы, если они имеют ценные хозяйственно-биологические признаки [14].

Методы культивирования яблони *in vitro* аналогичны методам для других растений. В основе лежат классические этапы, начиная от введения почек или кончиков побегов длиной в диапазоне от 0,3 мм до 1,0 см с предварительной стерилизацией различными химическими соединениями [6].

Затем экспланты культивируют в культуральных сосудах, содержащих, как правило, твёрдую питательную среду на основе агара. Наиболее часто используют питательные среды Мурасиге, Скуга (MS) и Кворина-Лепуавра (QL), которые содержат минеральные соли, углеводов и регуляторы роста, такие как цитокинин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), а также, возможно, применение некоторого количества ауксина и гиббереллина в зависимости от этапа микроразмножения и конкретного генотипа.

По мнению А. Пуа и С. Чонга [12] сорбитол, который является основной транспортной формой углерода у *Malus*, может быть более эффективен, чем сахароза.

Такой биологический ответ на сорбит может быть связан с наличием одного или нескольких ферментов. К этим ферментам относятся сорбитолдегидрогеназа, сорбитол-6-фосфатдегидрогеназа и сорбитолоксидаза, ответственные за метаболизм и ассимиляцию сорбита в тканях яблони [5].

Для некоторых генотипов флоридзин (PZ) - наиболее известное фенольное соединение яблони и флороглюцин (PG), который является продуктом распада флоридзина, иногда более чем в два раза ускоряет рост побегов, однако этот эффект, по-видимому, зависит от сорта и физиологического состояния растительных тканей [12].

В культуре *in vitro* на этапе микроразмножения у многих видов, в том числе яблони, микропобеги могут остановиться в активном росте и находится в таком состоянии продолжительное время. Кроме этого, как правило, это сопровождается формированием скрученных полупрозрачных листьев, это состояние описано как «витрификация» [11].

Однако, для выхода из этого состояния О. Джонес [9], в своей работе, приводит сведения о факторах, способных индуцировать активный рост и размножение. Добиться этого у микрорастений яблони можно путем модификации питательной среды, а именно, сменой концентрации агара, источника углерода, концентрацией азота, добавлением флоридзина или флороглюцина [9].

Растительные клетки, ткани и органы, культивируют *in vitro* на искусственных питательных средах, которые в своём составе имеют питательные вещества, необходимые для роста и развития до полноценного микрорастения. Ключевым фактором эффективности культивирования является подбор состава питательных сред, которые, как правило, содержат микроэлементы, макроэлементы, гормоны (регуляторы роста), аминокислоты, витамины и углеводы [13].

Обязательным элементом искусственной питательной среды являются сахара. Это связано с тем, что при инкубации клеток *in vitro* наблюдается явление гетеро/миксотрофии, для замены углерода, который растения обычно получают в процессе фотосинтеза из атмосферы.

Гетеротрофный тип питания возникает в результате низкой фотосинтетической активности эксплантов и его эффективность является решающей для их дальнейшего развития [8]. В результате того, что углеводы оказывают влияние на морфогенетические процессы, обладают осмотическим потенциалом, который влияет на скорость деления клеток, выполняют функцию в синтезе многих соединений, выступая в качестве строительных блоков макромолекул, а также могут контролировать некоторые процессы развития в клетке, они являются важнейшим элементом для растительных организмов [7].

Этап микроразмножения продолжается в зависимости от поставленных задач по требуемым объемам тиражирования конкретного сорта или подвоя и заканчивается пересадкой на искусственную питательную среду, стимулирующую образование корней.

Продолжительность этапа укоренения зависит от индивидуальных генетических особенностей конкретной формы растения и условий культивирования. Однако, индуктором корнеобразования обычно выступают ауксины (некоторые генотипы могут образовывать корни после продолжительного культивирования и без наличия ауксинов в питательной среде), которые добавляют в искусственную питательную среду. Наиболее часто применяют индол-3-масляную кислоту (ИМК) и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК).

Воздействие на микропобеги периодом темновой фазы при культивировании также может улучшить корнеобразование *in vitro* [16].

Поскольку подвойные формы обладают высокой способностью к укоренению, т. к. в происхождении многих генотипов подвоев принимали участие яблоня Недзведского (*Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne) и яблоня низкая (*Malus pumila* Mill.), то разработано много способов укоренения *in vitro* и акклиматизации *ex vitro*.

Имеются исследования, которые были направлены на упрощение способа получения полноценных растений слаборослых клоновых подвоев.

Способ заключается в укоренении микропобегов в темноте в нестерильных условиях в растворе ИМК. Таким методом было укоренено несколько сортов [17]. Поскольку подвойные формы обладают высокой способностью к укоренению, т. к. в происхождении многих генотипов подвоев принимали участие яблоня Недзведского (*Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne) и яблоня низкая (*Malus pumila* Mill.), то разработано много способов укоренения *in vitro* и акклиматизации *ex vitro*.

Имеются исследования, которые были направлены на упрощение способа получения полноценных растений слаборослых клоновых подвоев.

Способ заключается в укоренении микропобегов в темноте в нестерильных условиях в растворе ИМК. Таким методом было укоренено несколько сортов [17].

После стадии укоренения микрорастения высаживают в субстрат и переносят в условия повышенной влажности в теплицу для прохождения этапа акклиматизации.

В настоящее время в большей степени клональное микроразмножение используют для тиражирования подвойных форм, так как они генетически более предрасположены к вегетативному размножению. Однако, культивировании *in vitro* привойных компонентов которые трудно или невозможно размножить обычными методами позволяет сохранять генетическую коллекцию и поддерживать оздоровленный статус растений.

Таким образом, процесс клонального микроразмножения растений рода *Malus* принципиально не отличается от размножения других растений *in vitro*, однако предполагает существенные отличия в составе питательных сред. Это связано с физиологическими особенностями, характерными для растений этого рода. Основные разработки последних лет направлены на повышение эффективности индукции пролиферации и ризогенеза микропобегов, регенерации адвентивных побегов или зародышей из каллуса.

Список литературы:

1. Муратова С.А., Папихин Р.В. Влияние ультразвука на процесс ризогенеза при клональном микроразмножении декоративных растений / Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений: материалы II Международной научно - практической конференции. 2021. С. 137-138.
2. Новые перспективные подвойные формы селекции Мичуринского ГАУ / Р.В. Папихин, Н.Л. Чурикова, А.В. Кружков, З.Н. Тарова, Д.Ю. Честных, Л.В. Скороходова // Агротехнологические процессы в рамках импорт замещения: материалы Международной научно-практической конференции 25-

27 октября 2016г. посвящённой 85-летию со дня рождения заслуженного работника высшей школы РФ, доктора с. х. наук, профессора Ю.Г. Скрипникова. Мичуринск. 2016. С. 221-225.

3. Новые слаборослые клоновые подвои яблони / Н.М. Соломатин, Р.В. Папихин, Л.В. Григорьева, И.М. Зуева, Д.Ю. Честных, Н.Л. Чурикова Л.В. Скороходова // Вестник МичГАУ. №1. Ч. 1. 2012. С. 58-61.

4. Устойчивость клоновых подвоев яблони к почвенным патогенным микроорганизмам в многолетних производственных насаждениях / М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, А.В. Кружков, Н.Л. Чурикова // Наука и Образование. 2021. Т. 4. № 1.

5. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy source in morphogenesis of peach rootstock GF-677 / T. Ahmad, N.A. Abbasi, I.A. Hafiz, A. Ali // Pak. J. Bot. 2007. V. 39(4). P. 1264-1275.

6. Development of methods for introducing hybrid progeny of *Malus sieboldii* Rehd. at in vitro conditions / R. Papikhin, S. Muratova, M. Dubrovsky, E. Grigoryeva // E3S Web Conf. Innovative Technologies in Science and Education (ITSE-2020). 2020. V. 210.

7. Du Toit E., Robbertse P., Niederwieser J. Plant carbohydrate partitioning of *Lachenalia cv Ronina* during bulb production // Sci Hortic. 2004. V. 102(4). P. 433–440.

8. Fotopoulos S., Sotiropoulos T. In vitro propagation of the peach rootstock: the effect of different carbon sources and types of sealing material on rooting // Biol Plant. 2004. V. 48(4). P. 629–631.

9. Jones O.P. Propagation of apple in vitro. In: Ahuja M.R. (eds) Micropropagation of Woody Plants // Forestry Sciences. 1993. V 41. P. 169-186.

10. Muratova S.A., Papikhin R.V. The Effect of Ultrasound Irradiation on Induction of Callus Formation and Morphogenesis from the Leaf Discs of Apple Clonal Rootstocks / J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 10(10), 2018, 2592-2596.

11. Novatel J.C. L'utilisation des cultures in vitro pour la multiplication de quelques espèces légumières et fruitières // CR Acad Agric France. 1980. V. 66. P. 681-691.
12. Pua A.C., Chong C. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for in vitro propagation of *Malus robusta* // Can. J. Bot. 1984. V. 62. No. 5. P. 1545-1549.
13. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development / M. Yaseen, T. Ahmad, G. Sablok, A. Standardi, I.A. Hafiz // Mol. Biol Rep. 2013. V. 40. P. 2837-2849.
14. Simmonds J. Direct rooting of micropropagated M.26 apple rootstocks // Scientia Hort. 1983. V. 21. P. 233-241.
15. Wilkins C.P., Cabrera P., Dodd J.H. Tissue culture propagation of trees // Outlook on Agriculture. 1985. V. 14, P. 2-13.
16. Zimmerman R.H. Rooting apple cultivars in vitro: interactions amongst light, temperature, phloroglucinol and auxin // Plant Cell Tiss Org Cult. 1984. V. 3. P. 301-311.
17. Zimmerman R.H., Fordham I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1985. V. 110. P. 34-38.

UDC 674.031.734.2

APPLE CLONAL MICROPROPAGATION

Elena V. Grigorieva

postgraduate student

rigorieva-elena1615@yandex.ru

Alexey A. Privalov

postgraduate student

asher_satton@mail.ru

Roman V. Papikhin

Candidate of Agricultural Sciences,
Head of the Scientific Center for Biotechnology and Breeding

parom10@mail.ru

Irina A. Shamrina

student

all2585@mail.ru

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. The article deals with the issue of clonal micropropagation of plants of the genus *Malus*. Based on the analysis of the literature, it is shown that some forms of apple trees have a low multiplication factor. Information is given on methods of stimulating micropropagation at different stages of cultivation.

Key words: apple tree, *Malus*, clonal micropropagation, rooting, growth regulators.

Статья поступила в редакцию 14.02.2022; одобрена после рецензирования 12.03.2022; принята к публикации 25.03.2022. The article was submitted 14.02.2021; approved after reviewing 12.03.2022; accepted for publication 25.03.2022.