

**NEWS****OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN****SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES**

ISSN 2224-526X

Volume 5, Number 41 (2017), 101 – 105

**O. A. Ukibasov, N. A. Seraj**

Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: kem\_707@mail.ru

**ROOTING AND ADAPTATION OF SOME ROOTSTOCKS OF APPLE  
IN CULTURE IN VITRO**

**Abstract.** The results of the investigations of apple rooting and adaptation at clonal micro propagation are presented. The effect of the varietal features, nutrient medium, type, concentration and methods of the auxin application on apple rooting in vitro has been studied. MS medium with mineral base half diluted and with addition of indole-butyric acid (1mg/l) and naphthaleneacetic acid (1mg/l) occur to be mostly effective.

Established that optimal for micro propagation clonal rootstocks of Apple is the nutrient MS medium supplemented with 30 g / l sucrose, 0.5 mg / l BAP, 0.01 mg / l of IBA, 1.75 g / l gelrite, 4 g / l agar, pH. 5.7.

The final step in the production of plants by method in vitro from explants of different origin is the transfer of in vitro plants in non-sterile conditions, that is, their adaptation to the conditions of open ground. To achieve the minimum loss of the plants when planting is necessary to consider a number of factors, the main ones are: the General condition of the planted plants (growth, root development), the composition of soil substrate, humidity, time of landing and the temperature and light regimes.

**Keywords:** apple, *in vitro* culture, nutrient medium, adaptation, micro propagation, rootstock, rooting.

УДК 634.11.579

**О. А. Укибасов, Н. А. Серадж**

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

**УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ  
В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

**Аннотация.** В статье представлены результаты исследований укоренения и адаптации растений яблони в процессе клonalного микроразмножения. Изучено влияние сортовых особенностей, питательной среды, типа, концентрации и способов аппликации ауксинов на корнеобразование яблони *in vitro*.

Среда МС с разбавленной в два раза минеральной основой и с добавлением ИМК (1 мг/л) и НУК (1 мг/л) оказалась наиболее эффективной. Установлено что оптимальной для микреклонального размножения подвоев яблони является питательная среда МС с добавлением 30 г/л сахарозы, 0.5 мг/л БАП, 0.01 мг/л ИМК, 1.75 г/л джелрата, 4 г/л агар, pH 5.7.

Заключительным этапом при получении растений методом *in vitro* из эксплантов различного происхождения является перенос пробирочных растений в нестерильные условия, то есть их адаптация к условиям открытого грунта. Для достижения минимальной гибели растений при их высадке необходимо учитывать целый ряд факторов, основными из которых являются: общее состояние высаживаемых растений (их рост, развитие корневой системы), состав почвенного субстрата, влажность воздуха, сроки высадки и температурный и световой режимы.

**Ключевые слова:** яблоко, *in vitro*, питательной среды, адаптация, микро-размножение, подвой, укоренение.

**Введение.** До настоящего времени в Казахстане коллекции яблони содержались лишь в полевых условиях. Многолетняя работа фермеров, селекционеров-плодоводов находится под постоянной угрозой воздействия стихийных бедствий, аварийных загрязнений окружающей среды, биотerrorистических актов, военных действий, болезней, вредителей, и.т.п. Более того, в полевых коллекциях происходит потеря генетической идентичности из-за перекрестного опыления различных сорт-образцов. В связи с этим, недостатки традиционных приемов сохранения генетических ресурсов обусловили необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генофонда, такое как сохранение генетического материала в коллекциях *in vitro* [7-9].

Клонирование ценных сортов, подвоев, уникальных форм из минимального количества исходного материала по сравнению с традиционным (вегетативным) методом размножения имеет ряд преимуществ: возможность получать саженцы круглый год независимо от сезона; сокращение селекционного процесса за счет отбора форм по нужным признакам непосредственно в культуре *in vitro*; высокий коэффициент размножения. Использование асептических оздоровленных растений *in vitro* в международном обмене гермоплазмой облегчает процедуру прохождения карантинного контроля, так как современные стандарты на посадочный материал требуют оздоровления его от вирусной и микоплазменной инфекции [2-4].

Укоренение микропобегов плодовых культур является следующим важным и трудоемким этапом, от которого зависит успех микроразмножения. Важное значение на этапе ризогенеза отводится регуляторам роста, в первую очередь – ауксинам. Различная их концентрация, тип и способ обработки влияют на процесс укоренения микропобегов в условиях *in vitro* [3].

**Материалы и методы исследования.** В исследования включены 3 образца клоновых подвоев яблони (*Malus domestica* Borkh.) казахстанской и зарубежной селекции: Б 16-20, Жетысу 5, ММ 106. На этапе укоренения использовали ИМК, преимущественно в диапазоне концентраций 0,5–0,25 мг/л.

**Результаты и их обсуждение.** В исследованиях было изучено влияние различных концентраций ИМК – 0,5 мг/л, 0,25 мг/л, на укоренение микропобегов колонновидных подвоев, полученных в культуре *in vitro* из листовых эксплантов и апикальных почек (таблица).

Появление первых зачатков корней было отмечено в конце третьей недели культивирования побегов, наиболее активное корнеобразование – на 4-5 недели. Проведенные исследования показали, что у всех изученных генотипов самое активное корнеобразование – от 31,0 до 54,1% – дает присутствие в питательной среде ИМК в концентрации 0,25 мг/л. Близкие показатели по укоренению (32,8–43,8%) получены также при концентрации 0,5 мг.

Влияние различных концентраций ИМК на ризогенез *in vitro*

Подвой	Концентрация ИМК, мг/л	Укореняемость, %	Количество корней, шт./раст	Длина корней, см
ММ 106	0,5	43,8	2,5	2,7
	0,25	54,1	3,7	3,4
Жетысу 5	0,5	32,8	2,4	2,5
	0,25	31,0	2,1	2,7
Б 16-20	0,5	32,8	2,4	2,5
	0,25	31,0	2,1	2,7

Таким образом, для укоренения *in vitro* миропобегов подвоев яблони следует использовать концентрации ИМК 1 и 2 мг/л. Они дают наилучшее образование и рост корней.

Одним из самых сложных этапов является перенос укорененных пробирочных растений в нестерильные условия и их акклиматизация. В качестве субстрата для пересадки хорошо зарекомендовала себя смесь почвы, торфа, перлита и песка в объемном соотношении 1:1:1:1. Для предотвращения возможного заражения паразитическими нематодами и грибами В.Г. Трушечкин и соавторы рекомендуют почвенную смесь стерилизовать при температуре 80°C в течение 40 минут [5, 8]. Однако в последнее время многие авторы рекомендуют использовать готовую почвенную

смесь, приобретая ее в магазинах, так как в субстрат входит стерильный песок и биогумус, содержащий все необходимые элементы для жизнедеятельности растения (мг на 100 г сухого вещества): азот ( $\text{NH}_4+\text{NO}_3$ ) 20-250; фосфор ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) 100-500; калий ( $\text{K}_2\text{O}$ ) 100-500; кальций ( $\text{CaO}$ ) 1000-6000; магний ( $\text{MgO}$ ) 500-3000; железо ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 50-250. Этот субстрат не требует дополнительной обработки, что экономит время и средства [6].

У растений при перенесении в почву на первом этапе отмечалось замедление роста, наблюдалось потемнение, засыхание и сбрасывание листьев, большинство растений погибало. Исследования, направленные на выяснение причин, вызывающих гибель материала при пересадке в почву, показали, что у пробирочных растений, выращенных в условиях почти 100 процентной влажности воздуха, устьица широко открыты. В течение первых суток после пересадки, устьица так же оставались открытыми, что приводило к потере растениями большого количества воды [3]. Корни пробирочных растений практически не имеют корневых волосков, вследствие чего нарушено поглощение воды и минеральных солей из почвы. Следовательно, высокая транспирация листьев и низкая поглотительная способность корней вызывает гибель растений при пересадке в почву. К тому же через мерное увлажнение в дальнейшем, стимулировало некроз корневой системы. Для того чтобы повысить выживаемость растений при пересадке в почву многие авторы советуют использовать двух этапный метод адаптации. На первом этапе растения с развитой корневой системой переносили в асептических условиях в перлит, поливая  $\frac{1}{4}$  часть от нормы минеральных солей по T. Murashige и F.Skoog, а затем пересаживали эти растения в нестерильные условия почвенного субстрата с перлитом [1].

Считают, что лучшим сроком высадки растений в открытый грунт является период начала активного роста после покоя – это март-апрель. При высадке растения должны иметь 2 и более корней, длиной 2-3 см, высоту надземной части более 2 см. В качестве субстрата чаще всего используют смесь торфа, песка и почвы в соотношении 1:1:1. Субстрат обычно стерилизуют при температуре около 90°C в течение 2-3 часов. Наиболее благоприятный температурный режим +22°...+26°C, влажность воздуха должна составлять в течение первых двух недель адаптации не менее 90%, а в последующем 50-60%. Рекомендуемая освещенность должна составлять 3-5 тыс. люкс при 16-ти часовом фотопериоде.

С целью изучения способности к адаптации *in vivo* пробирочных растений-регенерантов подвоев яблони использовали формы ММ 106, Жетысу 5, Б 16-20, которые показали хорошую способность к размножению и укоренению *in vitro*.

В исследованиях для адаптации к нестерильным условиям отбирали растения высотой от 3 см и более, которые имели 4-5 настоящих листочков и корни длиной 1,5 и более см. Также использовали не укорененные побеги высотой 3 см и выше. По результатам ряда исследований для предотвращения развития грибной микрофлоры вокруг корней, которая может приводить к их загниванию и гибели растений, перед посадкой корневую систему тщательно отмывали от остатков питательной среды 1% раствором марганцовокислого калия. Не укорененные *in vitro* побеги для лучшей адаптации обрабатывали раствором ИМК [2].

Известно, что генотипические особенности исходных форм оказывают часто решающее влияние на подбор оптимальных концентраций ИМК и экспозиций обработки при адаптации *in vivo* плодовых и ягодных культур. В связи с этим диапазон используемых концентраций ИМК может колебаться в широких пределах – от 5 до 100 мг/л, а экспозиции обработки – от 3 мин до 24 часов (5). В исследованиях использовалась концентрация ИМК – 50 мг/л. с экспозицией обработки – 30 минут. Этим раствором обрабатывали базальные участки не укорененных побегов. После этого растения переносили в почвенный субстрат.

В качестве почвенного субстрата использовали смесь из торфа, песка и дерновой земли в соотношении 1:1:1. Часть этой смеси заранее стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 90°C в течение 3 часов.

Для высадки растений использовали торфоперегнойные горшочки размером 5x5 см, которые на 2/3 заполняли нестерилизованным почвенным субстратом, а оставшуюся 1/3 – стерильным. Почву увлажняли раствором минеральных солей по прописи МС. Высадку растений проводили, начиная с середины марта. Горшочки с растениями помещали в контролируемые условия при температуре +22°...+24°C, освещенности 3-5 тыс. люкс и 16часовом фотопериоде. В начале адап-

тации растения прикрывали прозрачной пленкой, которую периодически снимали в течение первых 10 дней, постепенно увеличивая продолжительность раскрытия с 30 минут до 8 часов [3].

При этом поддерживали высокую (более 90%) влажность воздуха. По истечении двух недель после посадки, влажность воздуха снижали до 60%. По мере подсыхания почвы ее увлажняли разбавленным вдвое раствором минеральных солей МС с добавлением в него ИМК в концентрации 1мг/л для усиления корнеобразования, в течение первых трех недель, а затем поливали обычной водой.

**Выводы.** Оптимальной для микроклонального размножения подвоев яблони является питательная среда МС с добавлением 30 г/л сахарозы, 0.5 мг/л БАП, 0.01 мг/л ИМК, 1.75 г/л джелрата, 4 г/л агар, pH. 5.7.

Для высадки растений использовали торфоперегнойные горшочки размером 5x5 см, которые на 2/3 заполняли нестерилизованным почвенным субстратом, а оставшуюся 1/3 – стерильным. Почву увлажняли раствором минеральных солей по прописи МС. Высадку растений проводили, начиная с середины марта. Горшочки с растениями помещали в контролируемые условия при температуре +22°...+24°C, освещенности 3-5 тыс. люкс и 16 часовом фотопериоде. В начале адаптации растения прикрывали прозрачной пленкой, которую периодически снимали в течение первых 10 дней, постепенно увеличивая продолжительность раскрытия с 30 минут до 8 часов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Рид Б.М. основы хранения vitro и криоконсервации // Национальный Клоновых хранилища зародышевой плазмы, Корваллис, О. р. США, 2002. – Р. 34-46
- [2] Линч Т.П., Бенсон Э.Э. Хардинг К. изменения климата: роль экс-situ и криосохранения в будущем безопасности экономически важных, вегетативно размножаемых растений // ж. Садоводческой науки и биотехнологии. – 2007. – Вып. 82. – Н. 2. – С. 157-160.
- [3] Рид Б.М. Растение Криоконсервации. Практическое Руководство. – Спрингер Наука + бизнес-Медиа, ООО, 2008. – 513 с.
- [4] Сальников Е.М. Перспективные сорта яблони для Юга и Юго-Востока Казахстана // Пособие для фермеров и садоводов-любителей. – Алматы 2010., – 80 с.
- [5] Dobránszki J., Silva J.A. Micropropagation of Apple // Biotechnology. Adv. – 2010, 28:462-488.
- [6] Ромаданова Н.В., Кушнаренко В. Микроклональное размножение некоторых сортов яблони: введение в культуру ин витро // Поиск. Серия естественных и технических наук.– № 1.– 2006.– С. 54-58.
- [7] Долгих С.Г., Карычев Г., Остаркова Л.В. Клональное микроразмножение и оздоровление сортов и подвоев яблони // Научные достижения в биотехнологии, виноградарстве и ягодоводстве – Алматы, НИЦ «Бастау». – 1997. – С. 3-7.
- [8] Фира А. Экстракорпоральное болезнь и экс-витро акклиматизации в яблоко (яблоня domestica) // Клуж-Напока: Бюл. Унив. СМА. ТСМ. и вет. мед. – 2010. В. 67. – № 1. – С. 480.

#### REFERENCES

- [1] Reed B.M. Osnovy vitro storage and cryopreservation, national Clonal germplasm repository, Corvallis O.R., USA, 2002. – R. 34-46
- [2] Lynch T.P., Benson E.E., Harding K., Climate change: the role of ex situ conservation and cryopreservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants // J. of Horticultural science and biotechnology. – 2007. – Vol. 82. – N. 2. – P. 157-160.
- [3] Reed B.M., Plant Cryopreservation. A Practical Guide. Springer Science + business Media, LLC, 2008., – 513 p.
- [4] Salnikov E.M. Promising Apple varieties for the South and South-East of Kazakhstan // the Handbook for farmers and gardeners. – Almaty, 2010., – 80 p.
- [5] Dobránszki J., Silva J.A. Micropropagation of Apple-a review // Biotechnology. Adv. – 2010, 28:462-488.
- [6] Romadanova N. In. With Kushnarenko.In. Micro propagation of some Apple varieties: an introduction to culture in vitro. // A series of natural and technical Sciences.– No. 1.– 2006.– S. 54-58.
- [7] With A Long G., To Karachev.G., Ostankova L.V. Clonal micropropagation and improvement of varieties and rootstocks of Apple // Scientific achievements in biotechnology, viticulture and berry growing, Almaty, research center "Bastau". – 1997. – P. 3-7.
- [8] Fira A. in vitro rooting and ex-vitro acclimatization in Apple (Malus domestica) // Cluj-Napoca: bull. Univ. AGR. SCI. and vet. Med. – 2010. V. 67. – No. 1. – S. 480.

**О. А. Укибасов, Н. А. Серадж**

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

**АЛМАНЫҢ КЕЙБІР ТЕЛІТУШІЛЕРІН IN VITRO КУЛЬТУРАСЫНДА ТАМЫРЛАНДЫРУ  
ЖӘНЕ БЕЙІМДЕУ**

**Аннотация.** Мақалада алма телітушілерін жеделдетіп микроклональді көбейту үшін коректік орта құрамын оптимизациялау.

Тамырланған регенеранттарды топырақ субстратында өсірудің және көшіру, аптацияның биотехнологиялық әдістерін жасау қарастырылған.

Алма телітушілерін микроклональді көбейту үшін оптимальді коректік орта МС-ке 30 г/л сахароза, 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрат, 4 г/л агар қосылған pH 5,7 болатындағы анықталды.

Тамырланған регенеранттарды отырғызуға бейтарапты, биогумуспен, түрлі дәрежеде шіріген шымтезек коспаларына құрылымдық компоненттер (өзен құмы, стерильді пенопласт) қосылған топыракты субстрат жарамды.

**Түйін сөздер:** алма, in vitro, коректік орта, бейімделу, микро көбейту, подвой, орнықтыруға.