

ЭФФЕКТИВНОЕ КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *MALUS SIEVERSII* ИЗ СЕМЯН

Ерболова Л.С.^{1*}, Байжуманова С.С.¹, Рахаткызы А.¹, Аубакирова К.П.¹, Бақытжанова Ж.Н.¹, Казыбаева С.Ж.², Кадирсизова Ж.К.², Галиакпаров Н.Н.¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, ул. Досмухамедова, 86, г. Алматы, 050012, Казахстан

²ТОО «Казахский научно-исследовательский институт плодовоовощеводства», ул. Гагарина 238/5, г. Алматы, 050060, Казахстан

*Yerbolova.Laura@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Дикая яблоня, *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. является ценным генетическим ресурсом, который требует различных методов сохранения. Изучено влияния различных концентрации гормонов на регенерацию дикой яблони из семян в условиях *in vitro* для создания оптимальной системы регенерации.

Семена *Malus sieversii*, до введения в культуру *in vitro*, были стратифицированы в различных субстратах в течение 1,5 месяцев в условиях низкой температуры и относительно высокой влажности для ускорения прорастания семян и повышения их всхожести. С использованием различных концентрации гормонов оптимизирован эффективный метод регенерации *Malus sieversii*, полученных из семян в культуре *in vitro*. Лучшие показатели развития побегов были на питательной среде С9, дополненной по 1 мг/л БАП и НУК соответственно. Введение в состав среды для укоренения 1,2 мг/л ИУК и 1 мг/л НУК привели к достоверному увеличению количества корней, длины корня и побега у исследуемого образца *M. sieversii*.

Ключевые слова: дикая яблоня, *Malus sieversii*, семена, питательная среда, клональное микроразмножение.

ВВЕДЕНИЕ

В Казахстане скоплены уникальные генетические ресурсы растительного агробιοразнообразия мирового значения. Среди них мировое значение получило плодое агробιοразнообразие дикой яблони (яблоня Сиверса – *Malus sieversii*, яблоня Недзвецкого – *Malus niedzwetzkyana*). Они произрастают и широко распространены в горных лесах Западного Тянь – Шаня, Каратау, Киргизского Алатау, Заилийского Алатау, Кетмена, Джунгарского Алатау и Тарбагатай. Гены дикой яблони встречаются практически у всех современных коммерческих сортов этой культуры. Несколько генетических исследований показали, что дикое яблоня *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. является дальним предком всех современных культивируемых видов яблонь [1-3].

В далеком 1929 году советский академик Н.И. Вавилов сказал, что именно горы Средней Азии являются центром происхождения яблок. Спустя 70 лет выводы Н.И. Вавилова подтвердили американские ученые. В 2002 году группа ученых из Оксфордского университета во главе с профессором-генетиком Барри Джунипером на молекулярно-генетическом уровне установила, что дикая яблоня Сиверса, произрастающая в горах на востоке и юго-востоке Казахстана, действительно является прародительницей всех культурных сортов яблонь – 46% генома современных сортов яблок унаследованы от яблони Сиверса из Казахстана, еще 21% от лесной яблони и 33% от неопределенных диких видов [4;5].

В настоящее время существует необходимость создания яблони, устойчивые к многочисленным стрессам. Однако традиционная обрезка и использование пестицидов неэффективны для сохранения деревьев. В качестве альтернативных методов могут быть применены биотехнологические методы, главным из них методы клонального

микроразмножения. Эти методы широко используются в плодовоовощеводстве и садоводстве. Несколькими исследователями были разработаны протоколы микроразмножения яблони с помощью почек, апикальных апексов и листьев [6-8].

Для каждого генотипа необходим тщательный подбор индивидуальных концентрации регуляторов роста и разработка оптимальных условий их использования. В работах Kakimzhanova A. et al разработан эффективный протокол микроразмножения культур *M. Sieversii* с использованием в качестве экспланта пазушных почек [9]. Большинство исследователей используют побеги, междоузлия, листья и другие органы в качестве экспланта в культуре *in vitro*. В опытах Dobranszki J, Teixeira da Silva JA в качестве экспланта использовали верхушки побегов или пазушные побеги, листья [10; 11]. Zhang et al. в своих исследованиях для индукции каллуса использовали экспланты листьев и стеблей 30-дневных побегов, размноженных *in vitro*. Чтобы определить наиболее эффективный состав среды для регенерации растений из листовых и стеблевых эксплантов, были исследованы различные соотношения концентраций гормонов [12]. В лаборатории криосохранения гермоплазмы Института биотехнологии и биологии растений разработаны протоколы клонального микроразмножения для различных плодово-ягодных культур, в том числе для яблони [13-16]. Этим исследованиям часто мешало потемнение тканей, вызванное окислением полифенолов из-за среза при введении их в культуру *in vitro*.

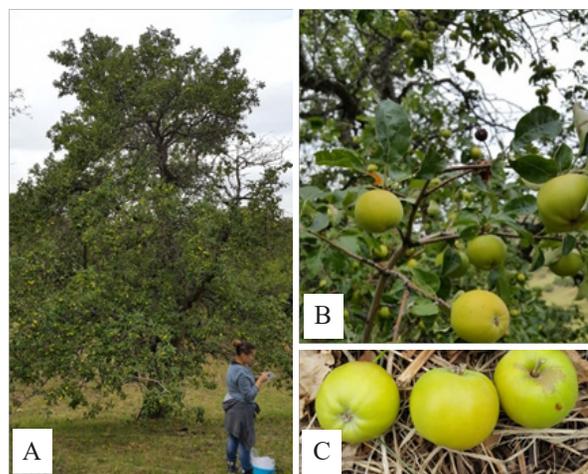
По данным Казахского научно-исследовательского института плодовоовощеводства, общая площадь садов с дикими яблонями *M. sieversii* составляет 14 307 гектар. 48% садов находятся на территории Казахстана и являются уникальным ценным богатством нашей страны. *M. sieversii* занесен в красную книгу Казахстана. Деревья ди-

кой яблони хорошо адаптированы к условиям Казахстана, но есть риски и угрозы их исчезновения и с каждым годом они увеличиваются. Они связаны с изменением климата, нерациональным использованием земель для сельского хозяйства, строительством дорог, домов и лесными пожарами, вирусные, бактериальные болезни и т.д. Следовательно, эта драгоценная гермоплазма срочно нуждается в эффективной защите [17], и *ex* и *in situ* сохранение популяций дикой яблони имеет глобальное значение [18].

Для сохранения биоразнообразия дикой яблони посредством *in vitro* размножения важен выбор исходного материала. Введение в *in vitro* культуру вегетативных органов (побеги, почки или меристема) позволяет сохранить конкретные генотипы, такие как редкие или желательные по своим признакам. Использование семян в *in vitro* позволит получать генетически неоднородный посадочный материал. Текущее исследование сосредоточено на изучение влияния различных концентрации гормонов на регенерацию дикой яблони из семян для создания эффективного протокола клонального микроразмножения *M. sieversii*. Также была оценка эффективности различных субстратов стратификации на всхожесть семян дикой яблони.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

В нашем исследовании использовались семена плодов дикой яблони *M. sieversii* трех образцов MS5, MS30 и MS31, собранные в горах Тау Турген (Рисунок 1). GPS-координаты каждого местоположения деревьев были записаны для дальнейшего исследования (Таблица 1). Высота деревьев 4-5 м, шарообразной кроной, плоды зеленовато-желтой окраски. Диаметр плода – в среднем 3-4 см. Образцы собирались с деревьев без видимых признаков поражения фитопатогенами.



А - общий вид; В - ветка с плодами; С – плоды

Рисунок 1 - Сбор образцов *M. sieversii* в горах Тау Турген

Плоды хранились в холодильнике для улучшения всхожести при +4 °С до последующего изъятия семян. Семена перед стратификацией поэтапно стерилизовались: в мыльном растворе – 15 мин; в проточной воде – 15 мин; этанолом – 1 мин; промывка бидистиллированной водой – 10 мин; обработка белизна+вода (1:1) – 2 мин; промывка автоклавированной водой – 3 раза.

Стратификация семян

Семена после стерилизации проходили стратификацию. Стратификация проводилась в трех вариантах: семена в чашках Петри с фильтровальной бумагой со стерильной дистиллированной водой в течении 1,5 месяца, при температуре +4 °С; семена в вермикулите в течении 1,5 месяца, при температуре +4 °С; семена в силикагеле в течении 1,5 месяца, при температуре +4 °С (Рисунок 2).

По истечении указанного срока, семена были введены в культуру *in vitro*. Для введения в культуру *in vitro* семена



А - семена в чашках Петри с фильтровальной бумагой со стерильной дистиллированной водой (К)

Б - семена в силикагеле

В - семена в вермикулите

Рисунок 2 – Стратификация семян *Malus sieversii* в различных субстратах

Таблица 1 - Характеристика места сбора образцов для исследования

Код образца	Высота исследуемого местоположения, м над уровнем моря	Географическая координата
MS5	1522	43°21'30.2»N 77°40'16.2»E
MS30	1528	43°21'25.8»N 77°40'20.7»E
MS31	1549	43°21'25.4»N 77°40'20.7»E

обрабатывали раствором отбеливателя «Белизна» (1:1) в течение 5 минут и промывали автоклавированной водой 3 раза в ламинарном боксе.

Введение в культуру и микроклональное размножение

Семена, перед введением в культуру очищались от кожуры и *in vitro* размножались на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей основные макро- и микроэлементы и витамины (PhytoTech Labs, USA) - 4,4 г/л, сахара - 30 г/л, поливинилпирролидон (ПВП) - 3 г/л, индолил-3-масляная кислота (ИМК) - 0,1 мг/л, агар - 6 г/л и различную концентрацию гормонов нафтилуксусной кислоты (НУК) с комбинацией бензиламинопурина (БАП) и рН 5,6 - 5,7 при 16-ти часовом фотопериоде (Таблица 2).

Объем питательной среды в каждой баночке по 25 мл. Растения культивировали в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности 2-3 тысячи люкс, длительность фотопериода 16 часов. Субкультивирование проводилось каждые 5 недель. Эксперимент проводился в 3-х кратной повторности по 15 растений в каждой. Коэффициент размножения рассчитывали по количеству побегов, полученных из одного семени.

Укоренение

Растение *Malus sieversii* длиной 3-5 см., после трех пересаживании на среде пролиферации, были индивидуально переведены на среду укоренения. Среда для укоренения содержала ½ МС с витаминами – 2,2 г/л, 15 г/л сахарозы, агар - 6 г/л, НУК и индолилуксусную кислоту

Таблица 2 - Концентрации гормонов

Среда пролиферации	Концентрация мг/л	
	БАП	НУК
СП 1 (К)	0	0
СП 2	0,5	0,0
СП 3	0,5	0,5
СП 4	0,5	1
СП 5	0,5	1,5
СП 6	0,5	2
СП 7	1	0,0
СП 8	1	0,5
СП 9	1	1
СП 10	1	1,5
СП 11	1	2

Таблица 3 - Концентрации НУК и ИУК для среды укоренения

Среда укоренения	Концентрация мг/л	
	ИУК	НУК
СУ 1	0	0
СУ 2	0,0	1
СУ 3	0,5	1
СУ 4	1	1
СУ 5	1,2	1
СУ 6	1,5	1

(ИУК) в различных концентрациях (Таблица 3).

В общей сложности были протестированы 6 вариантов среды для укоренения растений. Для каждого варианта были использованы по 15 регенерированных растений в 3-х кратной повторности.

Пересадка растений в *ex vitro* и их адаптация

Укорененные растения высотой 10 см и с 5-10 корнями были перенесены в почвенный субстрат. Корни растений, перед посадкой в почвенный субстрат, отмывались от агара проточной водой. Затем растений были перенесены в 500 мл горшки. В качестве субстрата использовали торф с вермикулитом в соотношениях 3:1 (об./об.). Горшки с растениями укрывали пластиковыми стаканчиками для поддержания высокого уровня влажности в течение 2 недель. Изначально было обеспечено достаточное количество воды. Пластиковый стакан через 7 дней был на половину отрезан и растения опрыскивались до раскрытия новых листьев. Через 2 недели пластиковый стакан был полностью снят и растения выращивали в лабораторных условиях (25°C днем, 20°C ночью, фотопериод 16/8 день/ночь и 75% относительной влажности) с периодическим поливом в течение 3 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ:

Стратификация семян Malus sieversii

Семена яблони, извлеченные из плодов, находятся в состоянии покоя. Способность семян к прорастанию появляется после воздействия на них пониженных температур

Таблица 4 – Влияние стратификации на всхожесть семян *M. sieversii*

Наименование образца	Кол-во семян, шт	Инфицированные, шт		Всхожесть семян, шт	
		шт.	%	шт.	%
Семена в стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге со стерильной дистиллированной водой (контроль)					
MS5	50	35	70	15	30
MS30	50	27	54	23	46
MS 1	50	29	58	21	42
Среднее	50	30	61	20	39
Семена в силикагеле					
MS5	50	15	30	35	70
MS30	50	20	40	30	60
MS31	50	13	26	37	74
Среднее	50	16	32	34	68
Семена в вермикулите					
MS5	50	10	20	40	80
MS30	50	6	12	44	88
MS31	50	8	16	42	84
Среднее	50	8	16	42	84
НСР ₀₅					23

при увлажнении и доступности воздуха. Во время стратификации семена постепенно выходят из состояния покоя.

В результате исследования был отмечен высокий процент всхожести у стратифицированных образцов в вермикулите (Таблица 4).

Представленные результаты в таблице 4 показали, что всхожесть семян дикой яблони зависит от способа стратификации. Всхожесть семян в чашках Петри со стерильной дистиллированной водой (К) в среднем составила 39%. Использование различных субстратов для стратификации способствует увеличению всхожести семян. Разница по сравнению с контролем в вариантах силикагел и вермикулит существенная, так как превышает значение НСР (23%). Также всхожесть семян в вариантах вермикулит по сравнению с силикагелем на 16% больше. В работах S. Hamill (2009) et. al. также продемонстрировано влияние вермикулита на раннее развитие и выживаемость косточковых плодов, выращенные *in vitro*. В их исследованиях обнаружены весьма значительные улучшения в развитии побегов и корней проростков, выращенные в питательной среде на основе вермикулита, по сравнению с эмбри-

онами, выращенные в обычной среде на основе агара [19].

Известно, что на развитие эксплантов при клональном размножении оказывает влияние ряда экзогенных и эндогенных факторов. В ходе экспериментов было изучено влияние гормонального состава питательной среды на развитие проростков образца MS30. При этом было испытано 11 вариантов питательной среды Мурасиге-Скуга с 3% сахарозой, с различными концентрациями гормонов НУК и БАП, 6 г/л агара при pH 5.6-5.8 (Таблица 2).

Рост пазушных и адвентивных побегов начался на 7-10 сутки культивирования (Рисунок 3).

На 30-е сутки культивирования проростков частота множественного побегообразования варьировало в зависимости от состава питательной среды, от 3 до 82,9% (Таблица 5).

При использовании семян в качестве экспланта для клонального размножения показано, что длина микропобегов, в зависимости гормонального состава питательной среды, варьировало от 5,4 до 31,2 мм, а количество побегов от 1,1 до 4,8 шт./эксплант. На безгормональной питательной среде наблюдали минимальное количество по-



Рисунок 3 - Развитие микропобегов из семян на первом этапе клонального микроразмножения

Таблица 5 – Влияние гормонального состава питательной среды на клональное размножение *M. sieversii* на этапе введения в культуру *in vitro* (образец MS30)

Питательная среда	Гормональные добавки в составе среды MS	Частота жизнеспособных растений, %	Длина побега, мм	Кол-во побегов, шт./эксплант	Кол-во оводненных побегов, %
C1 (К)	б/г	3,0±0,6	5,7±0,8	1,1±0,3	0
C2	БАП-0,5; НУК-0,0	6,2±2,3	5,4±1,6	1,6±1,5	0
C3	БАП-0,5; НУК-0,5	37±5,3	11,0±1,1	2,3±0,8	8,1±0,5
C4	БАП-0,5; НУК-1	56,7±3,3	21,5±2,5	2,1±1,7	5,1±1,2
C5	БАП-0,5; НУК-1,5	28±1,4	18,3±0,4	2,7±0,2	21,7±0,4
C6	БАП-0,5; НУК-2	28,7±4,0	20±2,3	3,1±1,8	37,5±3,2
C7	БАП-1; НУК-0,0	8,1±1,9	8,1±0,1	1,3±0,2	0
C8	БАП-1; НУК-0,5	51,9±1,2	20,1±3,1	4,2±0,3	3,4±0,2
C9	БАП-1; НУК-1,0	82,9±1,4	31,2±1,5	4,8±0,2	1,5±1,2
C10	БАП-1; НУК-1,5	40,5±0,7	17±0,8	2,9±1,2	11,8±0,8
C11	БАП-1; НУК-2	35,7±1,8	16,4±2,5	2,8±0,8	29,6±0,7

бегов на эксплант (1,1 шт.), а длина побегов составило всего 5,7 мм. Добавление в состав среды 0,5 мг БАП не способствовало существенному повышению показателей. При введении в состав среды БАП и НУК по 1 мг/л отмечали максимальное количество побегов (4,8 шт.) и частоту жизнеспособных растений (82,9%). Добавление в состав среды 0,5-1 мг/л БАП и НУК (C4, C8, C9 и C10) позволило получить относительно высокую частоту жизнеспособных растений, которая составила 40,5-82,9 %. А добавление НУК 1,5 и 2 мг/л способствовало формированию оводненных микропобегов (до 37,5%), что, в свою очередь, снижало их жизнеспособность. Таким образом, лучшие показатели развития побегов из семян были на питательной среде C9, дополненной по 1 мг/л БАП и НУК соответственно.

Основной задачей третьего этапа клонального размножения *Malus sieversii* является укоренение микропобегов. На данном этапе особое внимание нужно обращать на частоту ризогенеза, а также на развитие корневой системы. Хорошая корневая система играет важную роль при их адаптации к условиям *ex vitro*. Дальнейшая задача исследовательской работы оптимизация гормонального состава питательной среды для укоренения побегов *in vitro*. При анализе влияния гормонального состава питательной среды растениями высотой 35-50 мм культивировали на шести модификациях питательной среды MS, дополненной НУК и ИУК. В качестве контроля использовали безгормональную питательную среду (Таблица 4).

У исследуемого образца начало формирования корневой системы началось на 6-7 сутки выращивания и корни образовывались из нижнего узла (Рисунок 4).

На этапе укоренения, несмотря на содержание ½ MS, отмечали хорошее развитие побегов, длина которых варьировало от 35 мм до 72 мм, в зависимости от гормонального состава питательной среды (Таблица 6).

При добавлении в состав питательной среды 0,5 и 1 мг/л ИУК и 1 мг/л НУК у исследуемого образца наблюдали увеличение количество корней, длины корней по сравнению с контролем, но не давало статистический достоверного повышения ризогенной активности.

Введение в состав среды 1,2 и 1,5 мг/л ИУК и 1 мг/л НУК привели к достоверному увеличению количества корней и длины корня и побега у исследуемого образца *M. sieversii* (Таблица 5). На среде, дополненной 1,2 мг/л ИУК (количество корней -11,1 шт., длина корней – 41,3 мм) наблюдали хорошее развитие боковых корней, что важно при дальнейшей адаптации растений к условиям *ex vitro*.

Заключительным этапом микроклонального размножения является перенос растений в нестерильные условия выращивания и их адаптация к условиям *ex vitro*. Растения во время адаптации к нестерильным условиям подвергаются к сильному стрессу.

Крышки баночек, укорененных *in vitro* растений, на 5 дней приоткрывались и наливалось 20 мл дистиллированной воды.

Рисунок 4 – Укоренённые растение *Malus sieversii*

Таблица 6 – Влияние гормонального состава питательной среды на укоренение микропобегов *Malus sieversii in vitro* (образец MS30)

Питательная среда	Гормональный состав, мг/л	Количество корней, шт./побег	Длина корня, мм	Длина побега, мм
СУ1	ИУК-0; НУК-0	1,2±0,4	14,5±3,6	35±2,8
СУ2	ИУК-0; НУК-1	4,0±2,2	18,1±0,5	41±1,3
СУ3	ИУК-0,5; НУК-1	4,2±0,8	23,2±1,7	38±2,5
СУ4	ИУК-1; НУК-1	5,1±1,7	23,3±2,3	45±0,1
СУ5	ИУК-1,2; НУК-1	11,1±0,9	41,3±0,5	72±0,9
СУ6	ИУК-1,5; НУК-1	11,4±1,3	45,2±1,4	68±2,3
НСР ₀₅		6,3	10	12,1

Через пять дней хорошо укорененные растения постепенно приоткрывалась (Рисунок 5). Через 2 недели



А – первичная адаптация *in vitro* растений к условиям *ex vitro*; Б – перенос растений к условиям *ex vitro* (пластиковыми стаканчиками с закрытой крышкой); В – перенос растений к условиям *ex vitro* через 7 дней (пластиковыми стаканчиками с закрытой крышкой); Г – растения в условиях *ex vitro* через 10 дней; Д – растения в условиях *ex vitro* через 30 дней

Рисунок 5 – Растения *M. sieversii*, полученные после клонального размножения, на разных этапах адаптации к условиям *ex vitro*

саживали в горшки объемом 500 мл со стерильным субстратом торф с вермикулитом, в соотношении 3:1. Растения, для поддержания влажности, сразу же закрывались пластиковыми стаканчиками, через 3 дня крышка стакана

пластиковый стакан был полностью снят и растения выращивались в тепличных условиях (25°C днем, 20°C ночью, фотопериод 16/8 день/ночь и 75% относительной влажности) с периодическим поливом в течение 3 месяцев после

чего пересаживались в полевые условия.

В этом исследовании мы оптимизировали эффективный метод быстрой регенерации семян дикой яблони на питательных средах, дополненных различными концентрациями гормонов. Цитокинин и ауксин должны быть сбалансированы во время регенерации побегов из семян. В частности, высокая регенерация побегов из семян была достигнута на питательной среде, дополненной по 1 мг/л цитокинина (БАП) и ауксина (НУК), соответственно. Однако добавление ауксина больше 1 мг/л в питательную среду значительно снижало регенерацию побегов. Это указывает на то, что высокая концентрация ауксина ингибировала прямой органогенез побегов, но запускала соматический эмбриогенез [20]. В работах Meneguzzi et al. (2017) также сообщается, что 1 мг/л БАП была наилучшей концентрацией гормона для успешного размножения подвоя яблони (G.814) [21]. Напротив, семена, в питательной среде только цитокинином, демонстрировали наименьший процент регенерации. Регенерация побегов из семян происходит в процессе соматического эмбриогенеза, для которого обычно требуются оба гормона в соответствующих концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семена *M. sieversii*, до введения в культуру *in vitro*, были стратифицированы в различных субстратах в течение 1,5 месяца в условиях низкой температуры и относительно высокой влажности для ускорения прорастания семян и повышения их всхожести.

На основе проведенных исследований оптимизирован эффективный метод регенерации *M. sieversii*, полученных из семян в культуре *in vitro*, с использованием различных концентраций гормонов. Лучшие показатели развития побегов были на питательной среде С9, дополненной по 1 мг/л БАП и НУК соответственно. Введение в состав среды для укоренения 1,2 мг/л ИУК и 1 мг/л НУК привели к достоверному увеличению количества корней и длины корня и побега у исследуемого образца *M. sieversii*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование финансировалось за счет проектов:

НТП «Создание сортов и гибридов плодово-ягодных, орехоплодных культур и винограда на основе достижений био- и IT-технологий» на 2021-2023 гг.

AP09259392 «Устойчивые к *Erwinia amylovora* генотипы *Malus sieversii*» на 2021-2023 гг. КН МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА:

- Duan N, Bai Y, Sun H, Wang N, Ma Y, Li M, Wang X, Jiao C, Legall N, Mao L, et al. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nat. Commun.* 2017; 8(1):249. PubMed ID: 28811498. DOI: 10.1038/s41467-017-00336-7.
- Harris SA, Robinson JP, Juniper BE. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends Genet.* 2002; 18 (8):426–430. PMID: 12142012. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02689-6.
- Richards CM, Volk GM, Reilley AA, Henk AD, Lockwood DR, Reeves PA, Forsline PL. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet Genomes.* 2009; 5(2):339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9.
- Vavilov N. I. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan, the Caucasus, and the problem of the origin of fruit trees. 9th International Horticultural Congress, Reports and Proceedings, 1930. – P. 271-286.
- Джангалиев А.Д., Салова Т.М., Туреханова Р.М. Дикие плодовые растения Казахстана. – Алматы, 2001. – 135 с.
- Teixeira da Silva JA, Gulyas A, Magyar-Tabori K, Wang MR, Wang QC, Dobranszki J. In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta.* 2019; 249 (4):975–1006.
- Welander M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *J Plant Physiol.* 1988; 132: 738–744. DOI: 10.1016/s0176-1617(88)80238-4.
- Zhang X, Qin Y, Liang D, Zou Y, Ma FW. Enhancement of in vitro shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock G.41. *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2014; 50: 263–270.
- Kakimzhanova A., Dyussebekova D., Nurtaza A., Yessimseitova A., Shevtsov A., Lutsay V., Ramankulov Y., Kabieva S. An Efficient Micropropagation System for the Vulnerable Wild Apple Species, *Malus sieversii*, and Confirmation of Its Genetic Homogeneity. *Erwerbs-Obstbau.* 2022. DOI:10.1007/s10341-022-00720-8.
- Dobranszki J, Teixeira da Silva JA. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. *Sci Hortic.* 2011; 127:460–463. DOI:10.1016/j.scienta.2010.11.003
- Dobranszki J, Teixeira da Silva JA. In vitro shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2013; 88:60–66. DOI: 10.1080/14620316.2013.11512936.
- Zhang Y, Bozorov T.A, Li D.X, Zhou P, Wen X.J, Ding Y and Zhang D.Y. An efficient *in vitro* regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*) explants, *Plant Methods.* 2020; 16:56. DOI: 10.1186/s13007-020-00599-0.
- Ромаданова Н.В, Кушнаренко С.В. Микрклональное размножение некоторых сортов яблони: введение в культуру *in vitro* // Поиск. Сер. естеств. и техн. наук. - № 1. - 2006. - С.54–58.
- Ромаданова Н.В, Мишустина С.А, Матакова Г.Н, Рахимбаев И.Р, Кушнаренко С.В. Введение в культуру *in vitro* и микрклональное размножение перспективных сортов, клоновых подвоев и дикорастущих форм яблони // Исследования, результаты. - 2013. - № 3 (059). - С. 142–149.
- Romadanova N.V, Mishustina S.A, Matakova G.N, Kuhsnarenko S.V, Rakhimbaev I.R, Reed B.M. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan // *Acta Horticulturae.* – 2016. - Vol. 1113. - P. 271–277. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1113.40.
- Кушнаренко С.В, Ковальчук И.Ю, Ромаданова Н.В, Турдиев Т.Т. Криосохранение апикальных меристем плодовых и ягодных культур: метод. реком. / Б.М. Рид. - Алматы, 2008. - 58 с.
- Yang M, Li F, Long H, Yu W, Yan X, Liu B, Zhang

Y, Yan G, Song W. Ecological distribution, reproductive characteristics, and in situ conservation of *Malus sieversii* in Xinjiang, China. Hortscience. 2016; 51:1197–201.

18. Hokanson SC, Forsline PL, McFerson JR, Lamboy WF, Aldwinckle HS, Luby JJ, Djungaliev AD. Ex situ and in situ conservation strategies for wild *Malus* germplasm in Kazakhstan. Eucarpia Symposium on Fruit Breed Genet. 1998; 484:85–91.

19. Hamill S., Promchot S., Bignell G., Giles J., & Topp B. Vermiculite improves early development and survival of low chill stone-fruit embryos rescued in vitro. Acta Horticulture. 2009; (829), 79–84. DOI:10.17660/actahortic.2009.829.

20. Shukla PS, Das AK, Jha B, Agarwal PK. High-frequency in vitro shoot regeneration in *Cucumis sativus* by inhibition of endogenous auxin. Vitro Cell Dev Biol Plant. 2014; 50:729–37.

21. Meneguzzi A., Gonçalves M. J., Camargo S. S., Grimaldi F., Weber G. C., & Rufato L. Micropropagation of the new apple rootstock “G. 814.” *Ciência Rural*. 2017; 47(6). DOI:10.1590/0103-8478cr20160615.

REFERENCES:

1. Duan N, Bai Y, Sun H, Wang N, Ma Y, Li M, Wang X, Jiao C, Legall N, Mao L, et al. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nat. Commun.* 2017; 8(1):249. PubMed ID: 28811498. DOI: 10.1038/s41467-017-00336-7.

2. Harris SA, Robinson JP, Juniper BE. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends Genet.* 2002; 18 (8):426–430. PMID: 12142012. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02689-6.

3. Richards CM, Volk GM, Reilley AA, Henk AD, Lockwood DR, Reeves PA, Forsline PL. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet Genomes.* 2009; 5(2):339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9.

4. Vavilov N. I. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan, the Caucasus, and the problem of the origin of fruit trees. 9th International Horticultural Congress, Reports and Proceedings, 1930. – P. 271–286.

5. Dzhangaliev A.D., Salova T.M., Turehanova R.M. *Dikie plodovye rastenija Kazahstana.* – Almaty, 2001. – 135 s.

6. Teixeira da Silva JA, Gulyas A, Magyar-Tabori K, Wang MR, Wang QC, Dobranszki J. In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta.* 2019; 249 (4):975–1006.

7. Welander M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *J Plant Physiol.* 1988; 132: 738–744. DOI: 10.1016/s0176-1617(88)80238-4.

8. Zhang X, Qin Y, Liang D, Zou Y, Ma FW. Enhancement of in vitro shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock G.41. *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2014; 50: 263–270.

9. Kakimzhanova A., Dyussebekova D., Nurtaza A., Yessimseitova A., Shevtsov A., Lutsay V., Ramankulov Y., Kabieva S. An Efficient Micropropagation System for the Vulnerable Wild Apple Species, *Malus sieversii*, and Confirmation of Its Genetic Homogeneity. *Erwerbs-Obstbau.* 2022. DOI:10.1007/s10341-022-00720-8.

10. Dobranszki J, Teixeira da Silva JA. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. *Sci Hortic.* 2011; 127:460–463. DOI:10.1016/j.scienta.2010.11.003

11. Dobranszki J, Teixeira da Silva JA. In vitro shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2013; 88:60–66. DOI: 10.1080/14620316.2013.11512936.

12. Zhang Y, Bozorov T.A, Li D.X, Zhou P, Wen X.J, Ding Y and Zhang D.Y. An efficient *in vitro* regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*) explants, *Plant Methods.* 2020; 16:56. DOI: 10.1186/s13007-020-00599-0.

13. Romadanova N.V, Kushnarenko S.V. Mikroklonal’noe razmnozhenie nekotoryh sortov jabloni: vvedenie v kul’turu in vitro // *Poisk. Ser. estestv. i tehn. nauk.* - № 1. - 2006. - S. 54–58.

14. Romadanova N.V, Mishustina S.A, Matakova G.N, Rahimbaev I.R, Kushnarenko S.V. Vvedenie v kul’turu in vitro i mikroklonal’noe razmnozhenie perspektivnyh sortov, klonovyh podvoev i dikorastushhih form jabloni // *Issledovaniya, rezul’taty.* - 2013. - № 3 (059). - S. 142–149.

15. Romadanova N.V, Mishustina S.A, Matakova G.N, Kushnarenko S.V, Rakhimbaev I.R, Reed B.M. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan // *Acta Horticulturae.* – 2016. -Vol. 1113. - P. 271–277. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1113.40.

16. Kushnarenko S.V, Koval’chuk I.Ju, Romadanova N.V, Turdiev T.T. Kriosokhraneniye apikal’nyh meristem plodovyh i jagodnyh kul’tur: metod. rekom. / B.M. Rid. - Almaty, 2008. - 58 s.

17. Yang M, Li F, Long H, Yu W, Yan X, Liu B, Zhang Y, Yan G, Song W. Ecological distribution, reproductive characteristics, and in situ conservation of *Malus sieversii* in Xinjiang, China. Hortscience. 2016; 51:1197–201.

18. Hokanson SC, Forsline PL, McFerson JR, Lamboy WF, Aldwinckle HS, Luby JJ, Djungaliev AD. Ex situ and in situ conservation strategies for wild *Malus* germplasm in Kazakhstan. Eucarpia Symposium on Fruit Breed Genet. 1998; 484:85–91.

19. Hamill S., Promchot S., Bignell G., Giles J., & Topp B. Vermiculite improves early development and survival of low chill stone-fruit embryos rescued in vitro. *Acta Horticulture.* 2009; (829), 79–84. DOI:10.17660/actahortic.2009.829.

20. Shukla PS, Das AK, Jha B, Agarwal PK. High-frequency in vitro shoot regeneration in *Cucumis sativus* by inhibition of endogenous auxin. *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2014; 50:729–37.

21. Meneguzzi A., Gonçalves M. J., Camargo S. S., Grimaldi F., Weber G. C., & Rufato L. Micropropagation of the new apple rootstock “G. 814.” *Ciência Rural*. 2017; 47(6). DOI:10.1590/0103-8478cr20160615.

MALUS SIEVERSII-ДІ ТҰҚЫМ АРҚЫЛЫ ТИІМДІ КЛОНДЫ МИКРОКӨБЕЙТУ

Ерболова Л.С.^{1*}, Байжуманова С.С.¹, Рахатқызы А.¹, Аубакирова К.П.¹, Бақытжанова Ж.Н.¹, Казыбаева С.Ж.², Кадирсизова Ж.К.², Галиакпаров Н.Н.¹

¹М.А. Айтхожин атындағы биохимия және молекулалық биология институты, Досмухамедов көшесі, 86, Алматы қ., 050012, Қазақстан

²ЖШС «Қазақ жеміс-көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты», Гагарин көшесі 238/5, Алматы қ., 050060, Қазақстан

*Yerbolova.Laura@yandex.ru

ТҮЙІН

Жабайы алма, *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. әр түрлі сақтау әдістерін қажет ететін құнды генетикалық ресурс. Оңтайлы регенерация жүйесін құру үшін тұқым арқылы *in vitro* жағдайында өскен жабайы алманың регенерациясына әртүрлі гормон концентрациясының әсері зерттелді.

Malus sieversii тұқымдары, *in vitro* жағдайына енгізілгенге дейін, тұқымның өнуін тездету және олардың өнуін арттыру үшін төмен температура мен салыстырмалы түрде жоғары ылғалдылық жағдайында 1,5 ай бойы әртүрлі субстраттарда стратификацияланған. Гормондарды әртүрлі концентрацияда қолдану арқылы *in vitro* жағдайында тұқымдар арқылы көбейтілген *Malus sieversii* регенерациясының тиімді әдісі оңтайландырылды. Өскіндердің дамуының ең жақсы көрсеткіштері сәйкесінше 9-дан 1 мг/л БАП және НСК толықтырылған қоректік ортада болды. Тамырландыру қоректік ортасының құрамына 1,2 мг/л ИСК және 1 мг/л НСК енгізу зерттеліп отырған *M. sieversii* үлгісінің сабағы мен тамырының өсуі мен көбеюіне сенімді түрде әсер етті.

Негізгі сөздер: жабайы алма, *Malus sieversii*, тұқым, қоректік орта, клондық микрокөбейту.

EFFECTIVE CLONAL MICROPROPAGATION OF MALUS SIEVERSII FROM SEEDS

Yerbolova L.S.^{1*}, Baizhumanova S.S.¹, Rakhatkyzy A.¹, Aubakirova K.P.¹, Bakytzhanova Zh.N.¹, Kazybaeva S.Zh.², Kadirsizova Zh.K.², Galiakparov N.N.¹

¹Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin., st. Dosmukhamedova, 86, c. Almaty, 050012, Kazakhstan

²LLP «Kazakh Research Institute of Horticulture», St. Gagarina 238/5, c. Almaty, 050060, Kazakhstan

*Yerbolova.Laura@yandex.ru

ABSTRACT

Wild apple tree, *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. is a valuable genetic resource that requires various methods of conservation. The influence of various concentrations of hormones on the regeneration of wild apple from seeds under *in vitro* conditions was studied to create an optimal regeneration system.

Seeds of *Malus sieversii*, prior to introduction into *in vitro* culture, were stratified in various substrates for 1,5 months under conditions of low temperature and relatively high humidity to accelerate seed germination and increase their germination. Using various concentrations of hormones, an efficient method for the regeneration of *Malus sieversii* obtained from seeds in *in vitro* culture has been optimized. The best indicators of shoot development were on C9 nutrient medium supplemented with 1 mg/l of BAP and NAA, respectively. The introduction of 1.2 mg/l of IAA and 1 mg/l of NAA into the rooting medium resulted in a significant increase in the number of roots, the length of the root and shoot in the studied sample of *M. sieversii*.

Key words: wild apple tree, *Malus sieversii*, seeds, nutrient medium, clonal micropropagation.