

## ПРОИЗВОДСТВО СУПЕР-ЭЛИТНЫХ САЖЕНЦЕВ СОРТОВ И КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ

*Н.В. Ромаданова, М.М. Нурманов,  
И.А. Махмутова, С.В. Кушнарченко*

*РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК*

### **Аннотация**

В статье приведены результаты по укоренению в культуре *in vitro* сортов, клоновых подвоев (*Malus domestica* Borkh.) и дикорастущих форм яблони *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem и получению саженцев класса супер-элиты. Отработаны методики массового получения побегов в культуре тканей, укорененных побегов в культуре *in vitro* и адаптация растений *in vitro* к почвенному субстрату. Отработанная методика позволяет получать оздоровленные саженцы круглый год независимо от сезона. В результате сокращается селекционный процесс за счет отбора форм по нужным признакам непосредственно в культуре *in vitro*. Использование асептических оздоровленных растений *in vitro* от вирусной, бактериальной и микоплазменной инфекции в международном обмене гермоплазмой облегчает процедуру прохождения карантинного контроля.

Ключевые слова: яблоня, культура *in vitro*, криотерапия, оздоровленные саженцы

### **Введение**

Яблоня – основная плодовая культура в мире. Урожайность яблони во многих странах составляет 50-60 т/га, однако подобные результаты достигаются не всегда из-за пораженности яблоневого сада бактериальными, грибными и вирусными заболеваниями. В среднем по Казахстану урожайность за последние годы находилась в пределах 4 т/га. В плодовых насаждениях юга и юго-востока республики выявлено 7 вирусных заболеваний яблони, из которых наиболее вредоносные – хлоротическая пятнистость листьев

яблони (ACLSV), вирус растрескивания ствола (ямчатости древесины) (ASPV) и вирус борозчатости древесины (ASGV) [1-2]. В последние годы также отмечен всплеск распространения бактериальных и грибных заболеваний, особенно хочется отметить бактериальный ожог, вызываемый бактерией (*Erwinia amylovora*), который приводит к массовой потере урожая, а в последствии и всего яблоневого сада [3-4].

При этом природно-климатические условия юга и юго-востока Казахстана

благоприятствуют выращиванию высококачественных плодов яблок, отличающихся товарными качествами и отличными вкусовыми свойствами, они могут быть использованы также в лечебном питании, служить сырьем для переработки, в регионе можно выращивать яблоню в количествах достаточных для обеспечения населения Казахстана и экспорта [5]. Основной проблемой низких урожаев яблони в Казахстане является отсутствие интенсивных технологий оздоровления и выращивания посадочного подвойного и привойного материала.

Недостатки традиционных приемов выращивания яблони обусловили необходимость разработки биотехнологических методов оздоровления генофонда, закладке маточных садов материалом, размноженным в учреждениях, занимающихся производством оздоровленного посадочного материала класса супер-суперэлиты. Методами биотехнологии вегетативное потомство получают в культуре *in vitro* от единичного исходного растения, отобранного по сортовой (клоновой) типичности с гарантированной чистотой от всех известных вирусных, бактериальных и микоплазменных заболеваний [6-8].

В лаборатории криосохранения гермоплазмы Института биологии и биотехнологии растений разработаны методики получения оздоровленного посадочного материала. Получены протоколы

массового тиражирования асептических растений в культуре *in vitro*, с помощью микроклонального размножения, в результате чего достигается и освобождение от эндофитной инфекции [9-11]. Однако вирусную инфекцию яблони уничтожить такими способами практически невозможно. Анализ литературных данных и собственных исследований показал, что высокий процент растений, выращенных из меристем после криоконсервации (криотерапии), являются безвирусными [12-14]. На данный момент во многих лабораториях в различных странах мира пытаются решить эту проблему. В основном освобождением растительного материала от вирусов с помощью криотерапии занимаются в Китае, Турции, Корее, и др. Опубликовано достаточное количество материала с высокими результатами по криотерапии картофеля, батата, винограда, малины, банана, некоторых цитрусовых, хмеля, груши [12, 15-19]. Коллективом лаборатории достигнуты высокие результаты по получению безвирусных растений с помощью криотерапии картофеля (80%) и яблони (37,5%), криотерапия яблони была проведена впервые в мире. [20, 21]. Методика, разработанная в лаборатории, позволяет получать в короткие сроки с минимальными затратами растения *in vitro*, тестировать их инфицированность и оздоравливать пораженные растения с помощью криотерапии.

Целью настоящей работы являлось получение оздоровленных

саженцев сортов и клоновых подвоев яблони, размноженных и оздоровленных в культуре *in vitro*, которые в последствии послужат

элитным посадочным материалом для закладки маточников высокой категории чистоты

### Материалы и методика исследований

Объектами исследования являлись 39 образцов яблони из коллекции Казахского научно-исследовательского института плодоводства и виноградарства, Иле-Алатауского Национального парка, крестьянского хозяйства «Лиза» и крестьянского хозяйства ИП «Суздалева». Из них 13 районированных и перспективных сорта, 10 клоновых подвоев яблони (*Malus domestica* Borkh.) казахстанской и зарубежной селекции; сорта: Апорт Александр (2 образца), Апорт кроваво-красный (2 образца), Восход, Голден Делишес (2 образца), Голд Раш, Грушовка Верненская, Заря Алатау, Ренет Ландсбергский, Рояль Ред Делишес, Суйслеппер; клоновые подвои: Арм 18 (2 образца), Б 7-35, Б 16-20 (2 образца), Жетысу 5, ММ 106 (2 образца), 62-396 (2 образца), 15 форм дикорастущей яблони (*Malus sieversii* (Ledeb. M. Roem.) Kt., Kt1, Kt4, Kt5, Kt7, Kt8, Kt9, Kt10, Kt13, Kt19, Kt20, Kt21, Kt22, Kt23, ТМ-6 и 1 форма *Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne.

Введение в культуру *in vitro* побегов, полученных из пророщенных черенков, побегов, проросших в полевых условиях, и побегов, полученных из семян, а также тестирование полученных побегов *in vitro* на эндофитную инфекцию на специализированной

среде 523 проводили согласно методикам, описанным в статьях Ромадановой с соавторами [9-11, 22].

Микроклональное размножение проверенных асептических растений *in vitro*, проводили в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 16-ти часовом фотопериоде, побеги *in vitro* пассировали на свежую питательную среду с интервалом 3-4 недели.

Для оценки вирусной чистоты растительного материала проводили детекцию вирусов: хлоротической пятнистости листьев ACLSV, бороздчатости древесины яблони ASGV, ямчатости древесины яблони ASPV, мозаики яблони ApMV, кольцевой пятнистости томата ToRSV. Процедуру проводили согласно методике [23] с модификациями [20].

Для криотерапии использовали метод криоконсервации – витрификация с 0,3 М сахарозой, адаптированный для изолированных апикальных меристем яблони, описанный в статьях Кушнарченко С.В. с соавторами и Ромадановой Н.В. с соавторами [20, 24].

Укоренение побегов яблони в условиях *in vitro* проводили на следующих вариантах питательных

сред: 1) ½ Мурасиге и Скуга (МС), без гормонов (б/г), 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 (вариант 1); 2) ½ МС, б/г, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + предварительное выдерживание в растворе с 20 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) в течение 16 часов (вариант 2); 3) ½ МС, б/г, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7, + предварительное выдерживание в растворе с 20 мг/л индоллилмасляной кислоты (ИМК) в течение 16 часов (вариант 3); 4) ½ МС, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + 0,25 мг/л ИУК (вариант 4); 5) ½ МС, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + 0,25 мг/л ИМК (вариант 5). Растения выращивали в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, освещенности 40 μЕ•м<sup>-2</sup>•с<sup>-1</sup>, 16-ти часовом фотопериоде.

### Основные результаты исследований НИР

В результате многолетней работы в области микрклонального размножения и криоконсервации в лаборатории создана асептическая безвирусная коллекция яблони в культуре *in vitro*. Для следующей серии экспериментов была поставлена задача укоренить растения в культуре *in vitro* и получить саженцы класса супер-элиты.

Укоренение для последующего высаживания в почву – это один из наиболее сложных этапов культивирования древесных растений в культуре тканей. Поэтому важно было получить как можно больше регенерантов с корнями из побегов

Укорененные растения высаживали:

1) в почвенный субстрат «Готовый грунт универсальный», содержащий стерильный песок и биогумус, в состав которого входили (мг на 100 г сухого вещества) следующие микро-макро элементы: азот (NH<sub>4</sub>+NO<sub>3</sub>) 20-250; фосфор (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 100-500; калий (K<sub>2</sub>O) 100-500; кальций (CaO) 1000-6000; магний (MgO) 500-3000; железо (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 50-250 и перлит (вариант 1);

2) в стерильный чернозем, в лунки с перлитом или вермикулитом (вариант 2);

3) в смесь 1/1 готового почвенного субстрата и стерильного чернозема (вариант 3).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам, описанным в пособии Г.Ф. Лакина [25].

*in vitro*. Был проведен эксперимент по укоренению побегов яблони с использованием пяти вариантов питательных сред для укоренения на основе среды МС. На среде без гормонов (вариант 1) было получено не более 40% регенерантов с корнями, от 50% до 90% корнеобразования было достигнуто на средах с добавлением ИУК и ИМК, добавленных непосредственно в среду для корнеобразования (2, 3 вариант). Такой же результат был получен после того, как растения высаживали на среду с ½ МС без гормонов, предварительно выдерживая основания побегов в растворе 20 мг/л ИМК и 20 мг/л

ИУК в течение 16 часов. Соответственно варианты среды 2, 3, 4, 5 наиболее оптимальны для *in vitro* корнеобразования. Однако приготовление питательной среды непосредственно с гормонами, значительно упрощает процесс, чем выдерживание побегов *in vitro* в растворах с гормонами (рисунок 1).

Первые корешки на средах с добавлением ИУК и ИМК стали появляться уже через неделю, причем процент корнеобразования был несколько выше у регенерантов, которые культивировали на среде с ИУК – 53-91% в зависимости от сорта (рисунок 2 Б). Но образовавшиеся корни у побегов, обработанных раствором ИМК (ризогенез – 49-88%), были более мощными с множеством дополнительных

корешков, это увеличивает поглотительную способность корней при пересадке в почву (рисунок 2 А).

Таким образом, на всех опробованных нами средах стимулировалось корнеобразование. Показано положительное влияние ИУК и ИМК на укоренение яблони в культуре тканей. Для использования в лабораторных условиях наиболее оптимальной (упрощенной в приготовлении) является питательная среда (вариант 3):  $\frac{1}{2}$  МС, 0,25 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 (рисунок 2 В), питательные среды: 2, 4 и 5 также подходят для ризогенеза в качестве альтернативы.

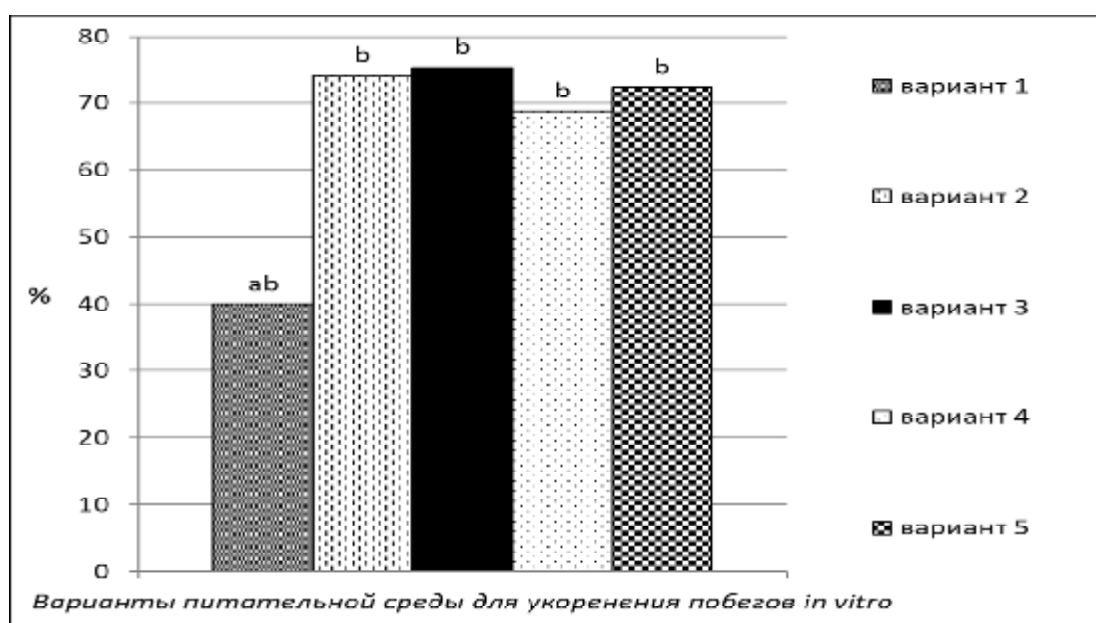
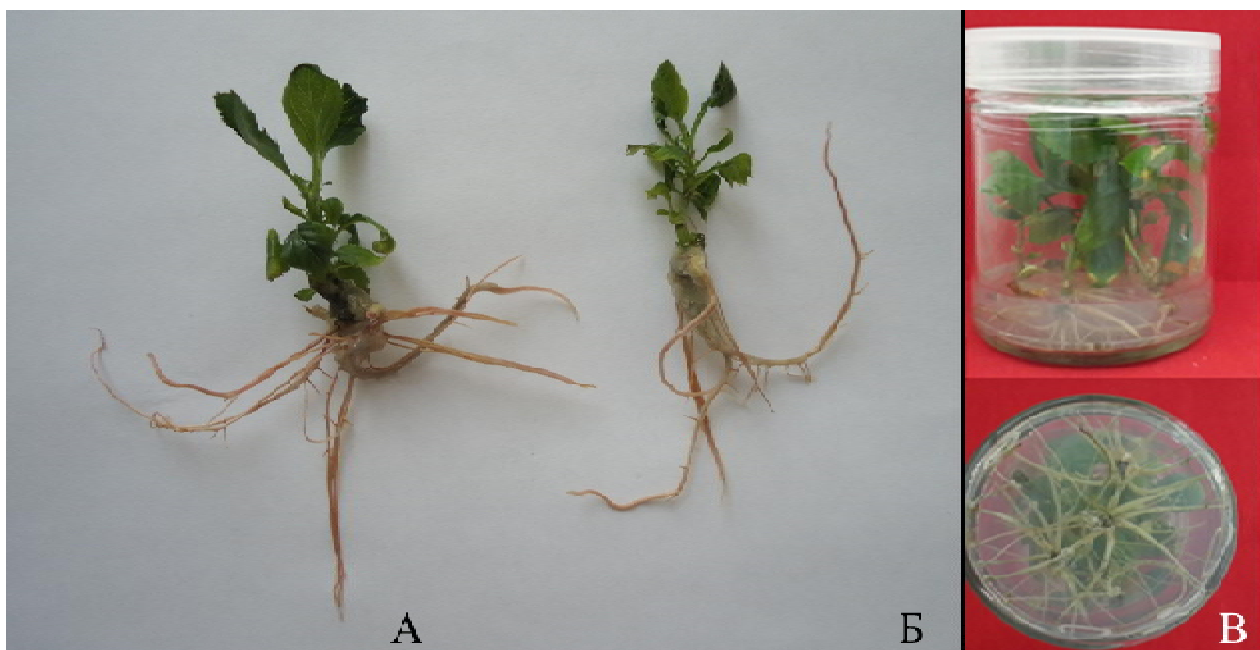


Рисунок 1 – Оптимизация состава питательных сред для укоренения яблони *in vitro*



А)  $\frac{1}{2}$  МС, 0,25 мг/л ИМК; Б)  $\frac{1}{2}$  МС, 0,25 мг/л ИУК

Рисунок 2 – Корнеобразование у побегов яблони сорта Восход после культивирования на питательной среде для укоренения

Нами были разработаны биотехнологические приёмы переноса, адаптации и выращивания, укоренённых регенерантов в почвенном субстрате. На первых этапах после переноса в грунт у растений наблюдалась некоторая приостановка роста, опадение листьев, загнивание корней. Погибало порядка 40% растительного материала. Основными причинами этого, по всей видимости, явились: сильный стресс и сложные условия адаптации пробирочных растений, нарушения процесса транспирации листьев и поглотительной способности корневой системы. В дальнейшем для лучшей приживаемости растительного материала, побеги первоначально стали помещать в лунку с

влажным, стерильным перлитом (для лучшего развития ещё сравнительно слабой корневой системы). Контейнеры сверху закрывали пластиковыми колпаками, создавая условия искусственного тумана, для сохранения влаги, необходимой для адаптации побегов и их защиты от внешних воздействий (рисунок 3 А). Через 3-4 недели растения адаптировались, колпаки можно было убирать (рисунок 3 Б). Полив осуществлялся по мере высыхания почвенного грунта, путем опрыскивания утром и вечером. Подкормка растворами минеральных солей Мурасиге и Скуга проводилась каждые 20-25 дней после высадки в грунт (рисунок 3).



А – перевод укорененного в культуре *in vitro* регенеранта яблони сорта Грушовка Верненская в почвенный субстрат; Б – адаптированный саженец яблони сорта Суйслеппер к условиям *in vivo*  
 Рисунок 3 – Получение оздоровленных саженцев яблони

Первую неделю укорененные регенеранты адаптировали к почвенному субстрату в светокультуральной комнате при 24°C, освещенность 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,

16-и часовой фотопериод. После чего саженцы переносили в теплицу, где они развивались при температуре от 10°C до 30°C при естественном освещении (рисунок 4).



А – общий вид теплицы; Б – адаптированные саженцы  
Рисунок 4 – Адаптация саженцев яблони к условиям теплицы

В результате экспериментов с различными вариантами почвенного субстрата не было отмечено разницы между вариантами. Для удешевления производства саженцев можно рекомендовать стерильный чернозем. На данном этапе приживаемость составляет более 90%.

#### **Обсуждение полученных данных и заключение**

Таким образом, нами изучен полный цикл развития яблони от её введения в культуру *in vitro* до переноса регенерантов в грунт. На этой основе создана коллекция гермоплазмы яблони в культуре тканей, а также получены тепличные оздоровленные саженцы готовые к реализации. В дальнейшем, коллекция асептических растений *in vitro* и полученные саженцы будут использоваться в научных

исследованиях, а также для получения супер-элитного подвойного и привойного материала для питомниководческих хозяйств, для вовлечения в селекционный процесс по улучшению существующих и созданию новых сортов и клоновых подвоев, а также для международного обмена генетическими ресурсами.

#### **Список литературы**

1. Бриндаров Д.Д. Диагностика вирусных болезней яблони: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата с.-х наук: 06.01.11. – Москва. – 2005 г. – 20 с.
2. Омашева М.Е., Качиева З.С., Копытина Д.А., Касенова А.М., Аубакирова К.П., Ережепов Д.А., Галиакпаров Н.Н., Рябушкина Н.А. Разработка диагностической тест системы на основе мультиплекс ОТ-ПЦР трех вирусов яблони ACLSV, ASGV, ASPV // «Поиск» серия естественных и технических наук. – №2 (1). – 2012. – С. 27-34.
3. Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А., Жармухамедова Г.А., Айткулов А.К. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан // Карантин растений. Наука и практика. – 2013. – № 1. – С. 39–43.
4. Хасенов С.С., Марс А.М., Амергужин Р.Ш, Бутаев К.М., Алиев М.С., Мухышов А.А., Сатин Г.Г., Токмурзина З.Х., Ходжаназарова С.К. Методические указания по учету и выявлению бактериального ожога плодовых деревьев // Методические рекомендации. – Астана, 2013 г. – 13 с.
5. Сальников Е.М. Перспективные сорта яблони для Юга и Юго-Востока Казахстана // Пособие для фермеров и садоводов-любителей. Алматы 2010. – 80 с.



6. Kausal N., Modgil M., Thakur M., Sharma D.R. *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds // Indian J. Exp. Biol. – 2005. – Vol. 43. – P. 561-565.

7. Трускинов Э.В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений // Биолог. разнообразие. Интродукция растений. – С.П., 2007. – С. 85.

8. Reed B.M., Tanprasert P. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 1995. – V. 1, N. 3. – P. 137-142.

9. Ромаданова Н.В., Кушнарченко С.В. Микрклональное размножение некоторых сортов яблони: введение в культуру *in vitro* // Поиск. Серия естественных и технических наук. № 1.– 2006. С. 54-58.

10. Ромаданова Н.В., Мишустина С.А., Матакова Г.Н., Рахимбаев И.Р., Кушнарченко С.В. Введение в культуру *in vitro* и микрклональное размножение перспективных сортов, клоновых подвоев и дикорастущих форм яблони // Издәністер, нәтижелер, Исследования, результаты. – Алматы. – № 3 (059). – 2013. – С. 142-149.

11. 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.

12. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method // Trends in Plant Science. – 2009. – V. 14, No. 3. – P. 119-122.

13. Feng C.H., Wang R., Li J., Wang B., Yin Z., Cui Z., Li B.Q., Bi W., Zhang Z., Li M., Wang Q.C. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants methods in molecular biology. – 2013. – V 994. – P. 463-482.

14. Li B.Q., Feng C.H., Hu L.Y., Wang M.R., Wang Q.C. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26' // An international journal of Annals of Applied Biology. – 2016. – Vol. 168. – I.1. – P. 142–150.

15. Wang Q.C, Liu Y., Xie Y., You M. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) // Potato Research. – 2006. – V. 49. – P. 119-129.

16. Wang Q.C., Mawassi M., Li P., Gafny R., Sela I., Tanne E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. // Plant Science. – 2003. – Vol. 165. – P. 321-327.

17. Wang, Q.C., Valkonen J.P.T. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy // Journal of Virological Methods. – 2008. – V. 154: – P. 135-145.

18. Şekerz M.G., Süzerer V., Elibuyuk I.O., Çiftçi Y.Ö. *In vitro* elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy // International journal of agriculture & biology. – 2015. – Vol. 17. – I. 5. – P. 1066-1070.
19. Nukari A., Laamanen J., Uosukainen M., Lemmetty A. Comparison of viruse eradication of apple mosaic virus from hop by encapsulation-dehydration cryotherapy and meristem culture methods // Acta Horticulturae. – 2014. – Vol. 1039. – P. 113-119.
20. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Gritsenko D.A., Omasheva M.Y., Galiakparov N.N., Reed B.M., Kushnarenko S.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus sp.*) // Cryo Letters. – London, 2015. – Vol. 37(1). – P 1-9.
21. Kushnarenko SV, Romadanova NV, Aralbayeva MM, Zholamanova SZ, Alexandrova AM, Karpova O. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro shoots // In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. – Vol. 53(361). – 2017. – P. 1-8.
22. Ромаданова Н.В. Серадж Н.А., Нурманов М.М., Карашолакова Л.Н. Введение в культуру *in vitro* дикорастущей яблони *Malus sieversii* // «Ізденістер, нәтижелер, Исследования, результаты» научный журнал – Алматы. – № 3 (75) – 2017. – С. 103-110.
23. Gasic K., Hernandez A., Korbani S. S. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction // Plant Molecular Biology Reporter. – 2004. – Vol.22. – P. 437a–437g.
24. Kushnarenko S., Romadanova N., Reed B. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips // Cryo Letters. – 2009. – Vol. 30 (1). – P.47-54.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высшая школа, 4 изд, – 1990. – 213 с.

## References

1. Brindarov D.D. Diagnostika virusnykh bolezney yablони: avtoreferat dissertatsii na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata s.-kh nauk: 06.01.11. – Moskva. – 2005 g. – 20 s.
2. Omasheva M.Ye., Kachiyeva Z.S., Kopytina D.A., Kasenova A.M., Aubakirova K.P., Yerezhpov D.A., Galiakparov N.N., Ryabushkina N.A. Razrabotka diagnosticheskoy test sistemy na osnove mul'tipleks OT-PTSR trekh virusov yablони ACLSV, ASGV, ASPV // «Poisk» seriya yestestvennykh i tekhnicheskikh nauk. – №2 (1). – 2012. – S. 27-34.
3. Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaymurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aytkulov A.K. Bakterial'nyy ozhog plodovykh kul'tur v Respublike Kazakhstan // Karantin rasteniy. Nauka i praktika. – 2013. – № 1. – S. 39–43.
4. Khasenov S.S., Mars A.M., Amerguzhin R.SH, Butayev K.M., Aliyev M.S., Mukhyshov A.A., Satin G.G., Tokmurzina Z.KH., Khodzhanazarova S.K.

Metodicheskiye ukazaniya po uchetu i vyyavleniyu bakterial'nogo ozhoga plodovykh derev'yev // Metodicheskiye rekomendatsii. – Astana, 2013 g. – 13 s.

5. Sal'nikov Ye.M. Perspektivnyye sorta yabloni dlya Yuga i Yugo-Vostoka Kazakhstana // Posobiye dlya fermerov i sadovodov-lyubiteley. Almaty 2010. – 80 s.

6. Kausal N., Modgil M., Thakur M., Sharma D.R. *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds // Indian J. Exp. Biol. – 2005. – Vol. 43. – P. 561-565.

7. Truskinov E.V. Kul'tura *in vitro* kak sovremennyy sposob vosproizvedeniya, sokhraneniya i introduktsii vegetativno razmnozhayemykh rasteniy // Biolog. raznoobraziye. Introduktsiya rasteniy. – S.P., 2007. – S. 85.

8. Reed B.M., Tanprasert P. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 1995. – V. 1, N. 3. – P. 137-142.

9. Romadanova N.V., Kushnarenko S.V. Mikroklonal'noye razmnozheniye nekotorykh sortov yabloni: vvedeniye v kul'turu *in vitro* // Poisk. Seriya yestestvennykh i tekhnicheskikh nauk. № 1. – 2006. S. 54-58.

10. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Matakova G.N., Rakhimbayev I.R., Kushnarenko S.V. Vvedeniye v kul'turu *in vitro* i mikroklonal'noye razmnozheniye perspektivnykh sortov, klonovykh podvoyev i dikorastushchikh form yabloni // Izdeniye, naitzheler, Issledovaniya, rezul'taty. – Almaty. – № 3 (059). – 2013. – S. 142-149.

11. 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.

12. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method // Trends in Plant Science. – 2009. – V. 14, No. 3. – P. 119-122.

13. Feng C.H., Wang R., Li J., Wang B., Yin Z., Cui Z., Li B.Q., Bi W., Zhang Z., Li M., Wang Q.C. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants methods in molecular biology. – 2013. – V 994. – P. 463-482.

14. Li B.Q., Feng C.H., Hu L.Y., Wang M.R., Wang Q.C. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26' // An international journal of Annals of Applied Biology. – 2016. – Vol. 168. – I.1. – P. 142–150.

15. Wang Q.C, Liu Y., Xie Y., You M. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) // Potato Research. – 2006. – V. 49. – P. 119-129.

16. Wang Q.C., Mawassi M., Li P., Gafny R., Sela I., Tanne E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. // Plant Science. – 2003. – Vol. 165. – P. 321-327.

17. Wang, Q.C., Valkonen J.P.T. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy // Journal of Virological Methods. – 2008. – V. 154: – P. 135-145.

18. Şekerz M.G., Süzerer V., Elibuyuk I.O., Çiftçi Y.Ö. *In vitro* elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy // International journal of agriculture & biology. – 2015. – Vol. 17. – I. 5. – P. 1066-1070.

19. Nukari A., Laamanen J., Uosukainen M., Lemmetty A. Comparison of viruse eradication of apple mosaic virus from hop by encapsulation-dehydration cryotherapy and meristem culture methods // Acta Horticulturae. – 2014. – Vol. 1039. – P. 113-119.

20. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Gritsenko D.A., Omasheva M.Y., Galiakparov N.N., Reed B.M., Kushnarenko S.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus sp.*) // Cryo Letters. – London, 2015. – Vol. 37(1). – P 1-9.

21. Kushnarenko SV, Romadanova NV, Aralbayeva MM, Zholamanova SZ, Alexandrova AM, Karpova O. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots // In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. – Vol. 53(361). – 2017. – P. 1-8.

22. Romadanova N.V. Seradzh N.A., Nurmanov M.M., Karasholakova L.N. Vvedeniye v kul'turu *in vitro* dikorastushchey yabloni *Malus sieversii* // «Ízdenister, nәtizheler, Issledovaniya, rezul'taty» nauchnyy zhurnal – Almaty. – № 3 (75) – 2017. – S. 103-110.

23. Gasic K., Hernandez A., Korbani S. S. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction // Plant Molecular Biology Reporter. – 2004. – Vol.22. – P. 437a–437g.

24. Kushnarenko S., Romadanova N., Reed B. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips // Cryo Letters. – 2009. – Vol. 30 (1). – P.47-54.

25. Lakin G.F. Biometriya // M.: Vysshaya shkola, 4 izd, – 1990. – 213 s.

## АЛМАНЫҢ СОРТТАРЫ МЕН КЛОНДЫ ТЕЛІТУШІЛЕРІНІҢ СУПЕР-ЭЛИТА КӨШЕТТЕРІН АЛУ

**Н.В. Ромаданова, М.М. Нурманов,  
И.А. Махмутова, С.В. Кушнарченко**

*РММ «Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институты» ҒК  
БҒМ ҚР*

Мақалада алма сорттарын, клонды телітушілерін (*Malus domestica* Borkh.) және жабайы алма формаларын *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem *in vitro* жағдайында тамырландыру және супер-элиита класындағы көшеттерді

алу бойынша нәтижелер келтірілген. Жасанды қоректік орталарда ұлпа дақылында өскіндерді жаппай алудың әдістемелері жасалды. *In vitro* жағдайында тамырландыру үшін қоректік орталардың құрамы оңтайландырылды. ½ МС, 0,25 мг/л ИМК, 1,75 г/л джелрайт, 4 г/л агар, рН 5,7 қоректік ортасы тиімді болып табылады.

Тамырланған *in vitro* өсімдіктер топырақ субстратына бейімделді. Өсімдік материалы жақсы жерсінуі үшін өскіндерді алдын-ала ылғал, зарарсыздалған перлит топырақ субстратына енгізу қажет, ылғалды сақтау үшін контейнерлерді пластикалық қақпақтармен жабу керек. Топырақтың кебуіне қарай өсімдіктерді таңертең және кешке сумен бұрку қажет, сондай-ақ топыраққа көшіргеннен кейін әр 20-25 күн сайын Мурасиге-Скуг минералды тұздарының ерітіндісімен үстеме қоректендіру керек. Топырақ субстраты ретінде «Дайын әмбебап топырақ», зарарсыздалған қара топырақ және дайын топырақ субстраты мен зарарсыздалған қара топырақтың 1/1 қоспасын пайдалануға болады.

Жасалған әдістеме супер-элита класына жататын көшеттерді жыл мезгіліне тәуелсіз жыл бойы алуға мүмкіндік береді. Нәтижесінде формаларды қажетті белгілері бойынша тікелей *in vitro* жағдайында іріктеу есебінен сұрыптау процесі қысқарады. Гермоплазмамен халықаралық алмасуда вирустық, бактериалды және микоплазмалық инфекциядан сауықтырылған асептикалық *in vitro* өсімдіктерді пайдалану карантиндік бақылаудан өту тәртібін жеңілдетеді.

## **PRODUCTION OF SUPER-ELITE PLANTING STOCKS OF APPLE VARIETIES AND CLONAL ROOTSTOCKS**

*N.V. Romadanova, M.M. Nurmanov,  
I.A Makhmutova., S.V.Kushnarenko*

*Institute of Plant Biology and Biotechnology*

The results of rooting in *in vitro* culture of apple varieties, clonal rootstocks (*Malus domestica* Borkh.) and wild *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem apple forms and the production of super-elite planting stocks are presented in the article. Methods of mass production of shoots in tissue culture on nutrient media have been worked out. The composition of nutrient media for rooting in *in vitro* culture was optimized, the most optimal nutrient medium consists of: ½ salts of Murashige and Skoog medium (MS), 0.25 mg/l Indole-3-butyric acid, 1.75 g/l gelrite, 4 g/l agar, pH 5.7.

*In vitro* rooted plants were adapted to the soil substrate. For better plantability, the shoots are initially required to be placed in a soil substrate in a hole with moist, sterile perlite, the containers should be covered from above with plastic caps to keep moisture. As the soil dries up, the plants need to be sprayed with water in the morning and in the evening, also it is necessary to fertilize the shoots with solutions of the mineral salts of MS medium every 20-25 days after planting in the soil. As the soil substrates are suitable "Ready to use universal soil",

sterile black earth and a 1/1 mixture of the prepared soil substrate and sterile black earth.

The proven technique allows to get healthy planting stocks all year round regardless of the season. As a result, the selection process is shortened by selecting the forms according to the needed characteristics directly in the *in vitro* culture. The use of *in vitro* aseptic, healthy plants from viral, bacterial and mycoplasma infection facilitates the procedure for quarantine control in the international exchange of germplasm.

**Keywords:** apple, *in vitro* culture, cryotherapy, healthy planting stocks

### **Благодарность**

Статья подготовлена в рамках проектов:

1. 0491/ГФЗ «Создание криогенного банка перспективных сортов и клоновых подвоев яблони на основе методов биотехнологии»
2. 0116-17-ГК «Производство суперэлитных саженцев плодовых и орехоплодных культур методами биотехнологии»