

# МОБИЛИЗАЦИЯ И СОХРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья

УДК 582.688.3:58.084.1:58.085.2

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-9-17



## Клональное микроразмножение отборных форм *Malus niedzwetzkyana* Dieck с высокой интродукционной устойчивостью в городских условиях

А. П. Беланова<sup>1,2</sup>, Ю. Г. Зайцева<sup>1</sup>, Е. М. Лях<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елена Михайловна Лях, llyakh@rambler.ru

**Актуальность.** В настоящее время использование междисциплинарного подхода, основанного на сочетании традиционных интродукционных методов и приемах клонального микроразмножения, позволяет решить одну из ключевых задач интродукции по созданию биоресурсных коллекций, состоящих из отборных экземпляров растений с ценными хозяйственными признаками, устойчивых к неблагоприятным условиям городской среды.

**Материалы и методы.** Проведенное интродукционное исследование выявило семь экземпляров *Malus niedzwetzkyana* Dieck, устойчивых к урбанизированным условиям, с высокими показателями развития кроны и долговечности. Данные растения послужили исходным материалом для разработки протокола клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* отборных форм этого вида.

**Результаты.** Установлено, что у *M. niedzwetzkyana* наиболее благоприятный срок взятия растительного материала для введения в культуру *in vitro* – начало периода активного роста вегетативных побегов после цветения. Самый оптимальный способ стерилизации растительного материала – ступенчатый режим с использованием спирта, гипохлорита натрия и нитрата серебра, позволяющий получить от 50 до 70% стерильных эксплантов и максимальный процент пролиферации меристем. На этапе микроклонального размножения сочетание 0,8 мг/л бензоаминапурина (БАП) с 0,14 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК) позволило существенно повысить коэффициент размножения (в среднем до  $5,3 \pm 0,7$ ) и улучшить морфометрические показатели микропобегов; максимальная частота пролиферации побегов составила 100%. Выход адаптированных к условиям *ex vitro* побегов составил 90%.

**Заключение.** Разработанный протокол клонального микроразмножения позволил ввести в культуру *in vitro* и размножить отборные формы *M. niedzwetzkyana* с целью создания ресурсной базы родового комплекса *Malus* Mill. для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

**Ключевые слова:** *Malus* Mill., размножение *in vitro*, пазушные меристемы, интродукция, городское озеленение

**Благодарности:** работа выполнена в рамках государственного задания согласно проектам АААА-А21-121011290027-6 и ААААА21-121011290025-2.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

**Для цитирования:** Беланова А.П., Зайцева Ю.Г., Лях Е.М. Клональное микроразмножение *in vitro* отборных форм *Malus niedzwetzkyana* Dieck с высокой интродукционной устойчивостью в городских условиях. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(3):9-17. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-9-17

## MOBILIZATION AND CONSERVATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-9-17

### *In vitro* clonal micropropagation of selected *Malus niedzwetzkyana* Dieck forms demonstrating high resilience when introduced into urban environments

Anastasia P. Belanova<sup>1,2</sup>, Yulianna G. Zaytseva<sup>1</sup>, Elena M. Lyakh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

**Corresponding author:** Elena M. Lyakh, llyakh@rambler.ru

**Background.** Currently, the use of an interdisciplinary approach based on a combination of traditional introduction methods and clonal micropropagation techniques makes it possible to solve one of the key problems of introduction – the establishment of bioresource collections consisting of selected plant accessions with valuable agronomic traits and resistance to unfavorable urban environments.

**Materials and methods.** A plant introduction study resulted in identifying seven specimens of *Malus niedzwetzkyana* Dieck with resilience to urban environments, high rate of crown development, and longevity. They served as source material for the development of a clonal propagation protocol and *in vitro* preservation of selected genotypes of this species.

**Results.** It was shown for *M. niedzwetzkyana* that the most favorable time for taking its plant material for introduction into *in vitro* culture is the beginning of the active growth of vegetative shoots after flowering. The most optimal sterilization technique for such plant material was a stepwise regime using alcohol, sodium hypochlorite, and silver nitrate: it provided from 50 to 70% of sterile explants and the maximum percentage of meristem proliferation. Combining 0.8 mg/L of benzylaminopurine (BAP) with 0.14 mg/L of indole-3-butyric acid (IBA) at the stage of microclonal propagation ensured a significant increase of the reproduction coefficient (on average up to  $5.3 \pm 0.7$ ) and an improvement in morphometric parameters of microshoots; the maximum frequency of shoot proliferation was 100%. The yield of shoots adapted to *ex vitro* conditions was 90%.

**Conclusion.** The developed clonal micropropagation protocol made it possible to introduce selected *M. niedzwetzkyana* forms into *in vitro* culture and reproduce them in order to set up a resource base for further fundamental and applied research into the system of the genus *Malus* Mill.

**Keywords:** *Malus* Mill., *in vitro* propagation, axillary meristems, introduction, urban gardening

**Acknowledgements:** the study was performed within the framework of the state task under Projects AAAA-A21-121011290027-6 and AAAAA21-121011290025-2.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**For citation:** Belanova A.P., Zaytseva Yu.G., Lyakh E.M. *In vitro* clonal micropropagation of selected *Malus niedzwetzkyana* Dieck forms demonstrating high resilience when introduced into urban environments. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(3):9-17. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-9-17

## Введение

Отбор и сохранение ценных форм растений, перспективных для хозяйственного использования, включая озеленение населенных мест, является одной из приоритетных задач научно-исследовательских центров и ботанических садов. В настоящее время активно создаются биоресурсные коллекции отдельных высокодекоративных родовых комплексов, адаптированных к конкретным урбанизированным территориям, которые являются базой для дальнейших селекционных исследований (Vasilyeva et al., 2018; Khlestkina, 2022; Khanbabaeva et al., 2023). Распространение и использование образцов из таких коллекций позволит в дальнейшем обеспечить питомники качественным посадочным материалом и закрыть запросы зеленого хозяйства на внедрение в городскую среду высокодекоративных устойчивых растений.

Среди древесных растений наиболее высокий интерес в данной области представляют красивоцветущие и пестролистные экземпляры, которые имеют ярко выраженный габитус. Такие растения являются акцентами городской среды и в значительной степени определяют эстетику ландшафтных объектов, формируя знаковую систему ориентиров. Однако именно эти растения в озеленении городов встречаются единично, поскольку зачастую представляют собой формы, обладающие высокой вариабельностью по устойчивости к различным экологическим факторам, дают расщепление при семенном размножении и трудно укореняются традиционными способами (Barsukova, 2022). Одним из таких растений является *Malus niedzwetzkyana* Dieck. Это высокие деревья, произрастающие в Средней Азии; отдельные экземпляры этого вида достигают 6 м в высоту, обладают живописным габитусом, насыщенным бордовым оттенком листьев кроны, ярко-розовыми цветами и фиолетово-красными плодами. *M. niedzwetzkyana* обладает не только высокими декоративными качествами, но и устойчивостью к засухе и грибным заболеваниям, благодаря чему является ценным генетическим ресурсом для селекции, а также используется в качестве подвоя для создания новых форм и сортов плодовых яблонь (Harris et al., 2002; Ji et al., 2015; Liu, 2018; Jiang et al., 2020).

В качестве декоративного растения в условиях городов Сибири *M. niedzwetzkyana* используется со второй половины 70-х годов XX века, однако в настоящее время эта яблоня все еще крайне редко встречается на объектах озеленения (Chindyaeva et al., 2018). *M. niedzwetzkyana* произрастает в Средней Азии и обладает высоким полиморфизмом по ряду признаков, что усложняет таксономическое определение растений и выражается в разногласиях в вопросах видовой принадлежности. Так, например, некоторые исследователи не признают самостоятельность вида *M. niedzwetzkyana*, а считают его формой яблони Сиверса: *M. sieversii* f. *niedzwetzkyana* (Dieck) Langenf. (Likhonos, 1974; Ji et al., 2015; Wang et al., 2015). Однако последние генетические исследования доказали низкое сходство *M. niedzwetzkyana* и *M. sieversii* (Yang et al., 2020).

Высокий полиморфизм *M. niedzwetzkyana* вызывает определенные трудности при интродукции и размножении растений с конкретными хозяйственно ценными признаками. Вероятно, высокий полиморфизм скорее можно объяснить тем, что имеется огромное количество гибридов с яблоней Недзветского, что не всегда указано. Анализ интродукционных работ в условиях сибирских

регионов указывает на высокую вариабельность *M. niedzwetzkyana* по таким качествам, как устойчивость к городским условиям среды и зимостойкость (Chindyaeva et al., 2018; Lechner, 2019), что существенно увеличивает риск гибели растений при озеленении и уменьшает эффект основных архитектурных достоинств растений как выразительного элемента ландшафтного объекта. Решением данной проблемы может быть отбор и последующее размножение устойчивых интродуцированных экземпляров *M. niedzwetzkyana* с использованием биотехнологического подхода. Клональное микроразмножение является одним из наиболее эффективных способов сохранения и тиражирования исходных ценных форм. Современные исследования показали высокую эффективность данного подхода при работе с представителями рода *Malus* Mill. (Romadanova., 2013).

Цель данного исследования – отбор устойчивых к городским условиям маточных форм *M. niedzwetzkyana* и разработка эффективного протокола их клонального микроразмножения для сохранения в коллекции *in vitro* и создания ресурсной базы для дальнейших селекционных и интродукционных работ.

## Материалы и методы

Для отбора конкретных маточных растений проводили оценку интродукционной устойчивости экземпляров *M. niedzwetzkyana*, произрастающих на городских объектах Новосибирска. В основу оценки устойчивости древесных растений и их реакции на воздействие неблагоприятных факторов в условиях урбанизированных территорий были заложены методики Т. Н. Встовской и И. Ю. Коропачинского (Vstovskaya, Koropachinsky, 2005), Л. Н. Чиндяевой с соавторами (Chindyaeva et al., 2018). Показатели устойчивости определяли путем систематических визуальных наблюдений за развитием растений (табл. 1). Проанализировали 20 растений на различных городских объектах. Растения, получившие наивысшие баллы, служили исходным материалом для дальнейшей разработки технологии размножения и сохранения *in vitro*.

В качестве эксплантов для введения экземпляров с высокой интродукционной устойчивостью в культуру *in vitro* использовали сегменты вегетативных побегов с пазушными и апикальными почками *M. niedzwetzkyana*. Для определения оптимальных сроков изоляции экспланты изолировали после окончания цветения в момент начала активного роста недревесневших вегетативных побегов (июнь) и в период одревеснения (август). Одревесневшие и недревесневшие побеги делили на узловыи сегменты около 1 см длиной и затем подвергали последовательной стерилизации. В качестве стерилизующих агентов использовали 96-процентный этиловый спирт, 1,0-процентный гипохлорит натрия и 0,1-процентный раствор нитрата серебра. Тестировали два режима ступенчатой стерилизации: 1-й режим – последовательные обработки 70-процентным раствором этилового спирта (2 с), 1,0-процентным раствором гипохлорита натрия (15 мин); 2-й режим – последовательные обработки 70-процентным раствором этилового спирта (2 с), 1,0-процентным раствором гипохлорита натрия (15 мин), 0,1-процентным раствором нитрата серебра (10 мин).

Асептические сегменты промывали в стерильной дистиллированной воде трижды и помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), дополненную 30 г/л сахарозы и 0,4 мг/л бензоаминапу-

**Таблица 1. Методика оценки интродукционной устойчивости древесных растений на урбанизированной территории****Table 1. Methodology for assessing the resilience of woody plants during their introduction to an urbanized area**

Диагностический показатель	Балл
Степень ежегодного вызревания побегов, побеги вызревают:	на 100% длины – 5 баллов на 75% длины – 4 на 50% длины – 3 на 25% длины – 2 побеги не вызревают – 1
Зимостойкость растений:	повреждений нет – 5 баллов обмерзает не более 50% однолетних побегов – 4 обмерзает до 50–100% длины однолетних побегов – 3 обмерзают двулетние и более старые части растений – 2 обмерзает крона до уровня снегового покрова – 1 обмерзает вся надземная часть или растения вымерзают целиком – 0
Структура и плотность кроны:	6 и более побегов на 1 двулетний побег – 5 баллов от 2 до 5 побегов достаточно – 4 новые побеги единичны, не более 5 на всем растении – 3 утрата типичной жизненной формы и габитуса – 2
Фактура кроны (характер облиствения):	однородная (облиственность 100%) – 5 баллов средняя, до 80% – 4 слабая, до 50% – 3 низкая, менее 50% – 2 очень низкая – 1
Долговечность в городской среде:	сохранение декоративных качеств, приближено к возрастным показателям в естественных условиях – 3 балла утрата декоративных качеств на 10–20 лет раньше, чем в естественных условиях – 2 утрата декоративных качеств на 21–40 лет раньше, чем в естественных условиях – 1
Устойчивость к болезням и вредителям:	растения не повреждаются – 3 балла повреждения единичные – 2 повреждения массовые – 1
<b>Итого:</b>	<b>Высокая устойчивость – 21–26 баллов</b> <b>Средняя устойчивость – 15–20 баллов</b> <b>Низкая устойчивость – 14 баллов и ниже</b>

рина (БАП). Через 6 недель культивирования подсчитывали долю стерильных жизнеспособных эксплантов. Для разработки этапа собственно микроразмножения побегов, полученные на стадии введения в культуру *in vitro*, отделяли от первичного экспланта и культивировали на питательной среде МС, содержащей БАП в концентрациях 0,4; 0,8; 1,6 мг/л БАП или 0,8 мг/л БАП в сочетании с 0,14 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Через 8 недель культивирования подсчитывали процент пролиферации, коэффициент размножения, длину побегов и количество листьев.

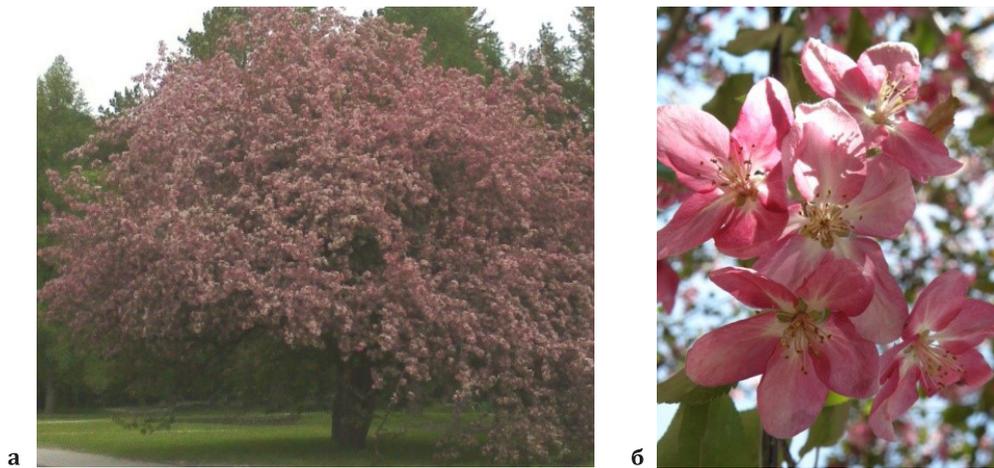
Для стимуляции ризогенеза побеги около 1 см длиной переносили на МС с сокращенным вдвое составом микро- и макроэлементов (1/2 МС), дополненную 0,1 мг/л ИМК в сочетании с 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). Продолжительность этапа укоренения составила 6 недель, после чего были подсчитаны следующие параметры: процент укоренившихся микропобегов, количество и длина корней, процент микропобегов с вторичными корнями. Адаптация асептической культуры к условиям *ex vitro* проводилась в специальных боксах с регулируемой системой освещения и влажностью. Укорененные *in vitro* микропобеги адаптировали в готовом торфяном субстрате «Агробалт-С» (Pindstrup, Россия), состоящем из верхового торфа pH 5,5–6,6 с добавлением комплекса минеральных удобрений и увлажня-

ющим реагентом. Все культуры содержали под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 3000 лк и периодом освещения 16 часов при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Эксперименты выполнены в трехкратной повторности. Статистическую обработку и анализ полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 8. Полученные данные обрабатывали с помощью двухфакторного и однофакторного дисперсионного анализа. Значимость различий между средними значениями проанализировали с помощью теста Дункана. Результаты в таблицах представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ( $M \pm m$ ).

### Результаты и обсуждение

Комплексное изучение генофонда яблонь в условиях интродукции является основой для мобилизации, сохранения и пополнения биоресурсных коллекций новых генотипов яблони, обладающих ценными хозяйственными признаками (Barsukova, 2022). Проведенное рекогносцировочное обследование зеленых насаждений г. Новосибирска показало, что *M. niedzwetzkyana* встречается на общественных ландшафтных объектах (городские сады и парки, улицы). Все экземпляры ежегодно цветут и плодоносят (рис. 1).



**Рис. 1.** *Malus niedzwetzkyana* Dieck в условиях городского озеленения: а – общий вид; б – цветение (фото А. П. Белановой)

**Fig. 1.** *Malus niedzwetzkyana* Dieck in urban landscaping: а – general view; б – flowering (photo by A. P. Belanova)

В ходе анализа устойчивости *M. niedzwetzkyana* на урбанизированной территории установлено, что наиболее высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам городской среды обладают экземпляры, произрастающие на общественных ландшафтных объектах (табл. 2).

Введение в культуру *in vitro* растений из рода *Malus* зачастую осложняется высоким содержанием фенольных соединений в тканях интактных растений, накопление которых имеет сезонную динамику (Vasil'eva et al., 2009). Окисление фенольных соединений в процессе изо-

**Таблица 2.** Оценка интродукционной устойчивости экземпляров *Malus niedzwetzkyana* Dieck (Новосибирск, 2023–2024 гг.)

**Table 2.** Assessment of the resilience of *Malus niedzwetzkyana* Dieck during its introduction into urban environments (Novosibirsk, 2023–2024)

Диагностический показатель	Городские сады и парки	Озеленение улиц	Дендрологический парк
Степень ежегодного вызревания побегов	5	5	5
Зимостойкость растений	5	5	5
Структура и плотность кроны	5	5	4
Фактура кроны (характер облиствения)	5	5	4
Долговечность в городской среде	2	2	1
Устойчивость к болезням и вредителям	3	3,1	1
<b>Итого, балл</b>	<b>25</b>	<b>22–25</b>	<b>20</b>

При этом исследуемые экземпляры оказались идентичны по признакам зимостойкости и степени вызревания побегов, в то время как показатели развития кроны и долговечности в интродукционной среде были выше в условиях общественных ландшафтных объектов. Наиболее существенные отличия среди исследованных образцов выявлены при диагностировании устойчивости к воздействию патогенов. При этом установлено, что наиболее устойчивые по этому признаку растения произрастали в городских парках и в зеленых насаждениях улиц (см. табл. 2). На основе полученных данных было отобрано семь маточных растений *M. niedzwetzkyana*, показавших наибольшую интродукционную устойчивость на городской территории; из них шесть растений из уличного озеленения и одно растение с территории городского парка. Отобранные растения *M. niedzwetzkyana* служили исходным материалом для дальнейшей разработки протокола клонального микроразмножения и сохранения *in vitro*.

лации эксплантов приводит к замедлению роста, снижению регенерационной способности и в конечном итоге к некрозу эксплантов (Uchendu et al., 2011). В этой связи определение оптимальных сроков изоляции эксплантов, наряду с подбором эффективного режима стерилизации, является одной из важнейших задач при введении в культуру *in vitro*. Выявление оптимального периода взятия растительного материала для введения в культуру *in vitro* проводилось у различных представителей рода *Malus* (Matushkina, Pronina, 2008; Romadanova et al., 2008; Churikova, 2019; Nurtaza et al., 2019). Установлено, что оптимальными для изоляции могут быть как период зимнего покоя и начала выхода из него (февраль – март), так и период активного роста (май – июнь). При этом наиболее высокие ростовые показатели при регенерации отмечены при использовании неодревесневших эксплантов.

В наших экспериментах сегменты побегов с апикальными и пазушными почками *M. niedzwetzkyana* изолиро-

вали в начале июня (неодревесневшие) и августе в период одревеснения. При этом установлено, что степень контаминации неодревесневших эксплантов по сравнению с одревесневшими была ниже и регенерационный потенциал выше. Таким образом, оптимальным сроком изоляции эксплантов *M. niedzwetzkyana* является начало периода активного роста вегетативных побегов после цветения. Из испытанных способов стерилизации наиболее эффективным оказался 2-й ступенчатый режим с использованием спирта, гипохлорита натрия и нитрата серебра. Этот способ позволил получить от 50 до 70% стерильных эксплантов и максимальный процент пролиферации меристем (табл. 3).

повышает такой показатель, как число побегов на эксплант, но и способствует элонгации вновь полученных побегов у *M. sieversii* (Kakimzhanova et al., 2023).

В представленной работе испытывали влияние БАП и ИМК на пролиферацию меристем и ростовые параметры регенерантов *M. niedzwetzkyana*. На данном этапе максимальный процент пролиферации побегов был на уровне 100% во всех испытанных вариантах сред. Из испытанных концентраций БАП наибольший коэффициент размножения получен в присутствии 0,8 мг/л этого регулятора роста. Длина побегов и число листьев существенно не зависели от концентрации этого цитокинина в среде (табл. 4).

**Таблица 3. Влияние способов стерилизации и стадии развития эксплантов на выход асептических эксплантов и пролиферацию меристем *Malus niedzwetzkyana* Dieck**

**Table 3. The effect of sterilization techniques and explant development stages on the yield of aseptic explants and meristem proliferation of *Malus niedzwetzkyana* Dieck**

Стадия развития эксплантов	Способы стерилизации	% с контаминацией	% асептических эксплантов	% пролиферации меристем
ОП	70-процентный раствор этилового спирта (2 с) 1,0-процентный раствор гипохлорита натрия (15 мин)	75 b	25 c	12 c
	70-процентный раствор этилового спирта (2 с) 1,0-процентный раствор гипохлорита натрия (15 мин) 0,1-процентный раствор нитрата серебра (10 мин)	50 c	50 b	31 b
НП	70-процентный раствор этилового спирта (2 с) 1,0-процентный раствор гипохлорита натрия (15 мин)	90 a	10 d	7 cd
	70-процентный раствор этилового спирта (2 с) 1,0-процентный раствор гипохлорита натрия (15 мин) 0,1-процентный раствор нитрата серебра (10 мин)	30 d	70 a	56 a
<b>Значение двухфакторного дисперсионного анализа:</b>				
«стадия развития эксплантов»		++*	++	++
«способ стерилизации»		++	++	нз**
«стадия развития эксплантов» × «способ стерилизации»		++	++	++

Примечание: данные приведены в виде средних значений, средние значения, за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются в соответствии с тестом Дункана ( $p = 0,05$ ); ОП – одревесневшие побеги; НП – неодревесневшие побеги; \* – достоверно при  $p < 0,05$ ; \*\* – недостоверно

Note: the data are presented as mean values; the means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ( $p = 0.05$ ); ОП – lignified shoots, НП – non-lignified shoots; \* – significant at  $p < 0.05$ ; \*\* – insignificant

На этапе собственно микроразмножения ключевую роль играет подбор оптимальных концентраций и соотношений экзогенных регуляторов роста растений. При этом БАП наиболее часто используют для активации меристем эксплантов представителей рода *Malus* (Ji et al., 2008; Magyar-Tábori et al., 2010; Papikhin et al., 2020; Nurtaza et al., 2023). Недавние исследования показали, что сочетание БАП и гиббереллиновой кислоты не только

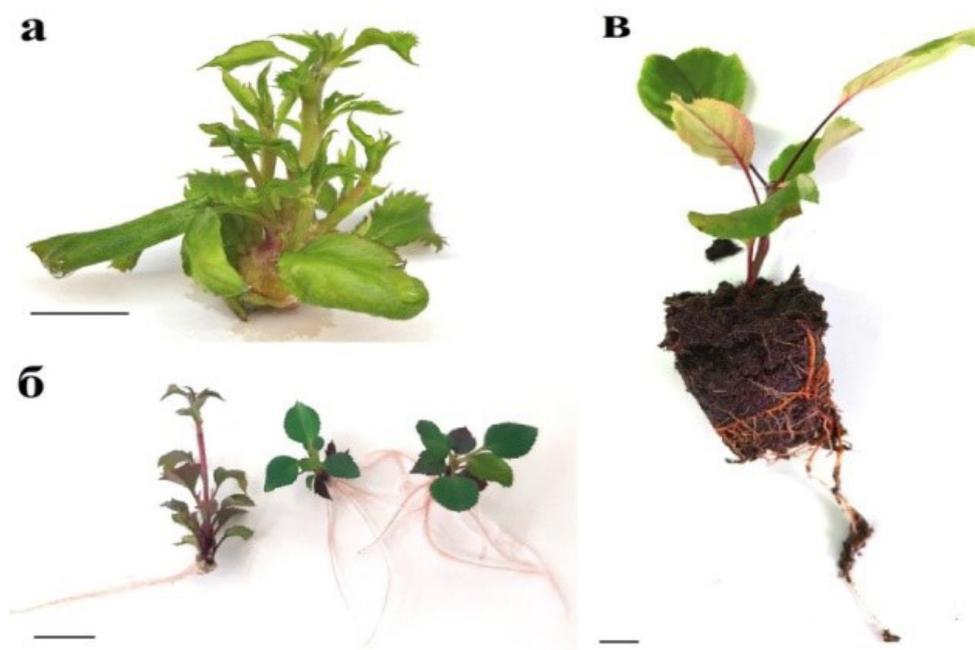
Однако сочетание 0,8 мг/л БАП с 0,14 мг/л ИМК позволило существенно повысить коэффициент размножения (в среднем до  $5,3 \pm 0,7$ ) и улучшить морфометрические показатели микропобегов (см. табл. 4; рис. 2, а). Таким образом, использование 0,8 мг/л БАП в сочетании с 0,14 мг/л ИМК позволяет наиболее эффективно реализовать морфогенный потенциал пазушных меристем *M. niedzwetzkyana* на этапе микроразмножения.

**Таблица 4.** Влияние БАП и ИМК на микроразмножение *Malus niedzwetzkyana* Dieck**Table 4.** The effect of BAP and IBA on *Malus niedzwetzkyana* Dieck micropropagation

Концентрация регуляторов роста растений, мг/л		% пролиферации меристем	Коэффициент размножения	Средняя длина побегов, см	Среднее число листьев
БАП	ИМК				
0,4	–	100 a	1,5 ± 0,2 c	1,1 ± 0,01 bc	3,2 ± 0,03 b
0,8	–	100 a	2,7 ± 0,1 b	1,2 ± 0,01 b	3,5 ± 0,05 b
1,6	–	100 a	2,3 ± 0,3 bc	0,9 ± 0,09 c	2,7 ± 0,07 c
0,8	0,14	100 a	5,3 ± 0,7 a	1,5 ± 0,06 a	4,8 ± 0,09 a

Примечание: данные приведены в виде средних значений и ошибок среднего; значения, за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются в соответствии с тестом Дункана ( $p = 0,05$ )

Note: the data are presented as mean values and errors of the mean; the values followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ( $p = 0.05$ )



**Рис. 2.** Клональное микроразмножение *Malus niedzwetzkyana* Dieck: а – микропобеги; б – укоренившиеся микропобеги; в – растения, адаптированные к условиям *ex vitro*; Bar – 10 мм

**Fig. 2.** Clonal micropropagation of *Malus niedzwetzkyana* Dieck: а – microshoots; б – rooted microshoots; в – plants acclimated *ex vitro*; Bar – 10 mm

Для дальнейшей стимуляции ризогенеза микропобеги длиной более 1 см культивировали на 1/2 МС, дополненной 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ИУК. В результате удалось получить 65% микропобегов с хорошо развитой корневой системой. При этом число корней в среднем составило  $3,7 \pm 0,1$ , а их длина –  $3,9 \pm 0,02$  см (рис. 2, б).

Выход растений-регенерантов, адаптированных к условиям *ex vitro*, составил 90%. Через десять дней после адаптации отмечены побеги, имевшие два новых листа, и прирост в среднем на 0,8 см (рис. 2, в).

В итоге впервые разработан протокол введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения отборных форм *Malus niedzwetzkyana*, обладающих высокой интродукционной устойчивостью, которые позволили пополнить биоресурсную коллекцию для дальнейших селекционных и интродукционных работ.

### Заключение

В представленном исследовании на основе оценки интродукционной устойчивости впервые отобраны наиболее перспективные хозяйственно ценные формы *M. niedzwetzkyana*, послужившие исходным материалом для клонального микроразмножения. Впервые разработан эффективный протокол клонального микроразмножения отобранных форм *M. niedzwetzkyana* и определены сроки изоляции эксплантов для успешного получения культуры *in vitro*. Установлено, что оптимальным способом получения асептических эксплантов является их ступенчатая стерилизация с использованием 70-процентного спирта, 1,0-процентного гипохлорита натрия и 0,1-процентного нитрата серебра. Максимальные показатели размножения и развития побегов получены под действием 0,8 мг/л БАП с 0,14 мг/л ИМК.

Таким образом, продемонстрированное сочетание методов традиционной оценки интродукционной устойчивости и клонального микроразмножения представляет собой комплексный высокотехнологичный междисциплинарный подход к отбору хозяйственно ценных форм для пополнения биоресурсных коллекций, которые в свою очередь позволяют создать устойчивую базу для дальнейших фундаментальных исследований и прикладных разработок. В результате использования данного подхода отобраны и поддерживаются в коллекции *in vitro* устойчивые к низким температурам и условиям урбанизированных территорий формы высокодекоративного вида – *Malus niedzwetzkyana*. Сохранение хозяйственно ценных форм растений методом *in vitro* позволит создать ресурсную базу родового комплекса *Malus*, которая может быть использована для массового получения адаптированного посадочного материала яблонь для озеленения городских территорий, что является ценной основой для дальнейших селекционных и интродукционных работ.

### References / Литература

- Barsukova O.N. Niedzwetzky's apple (*Malus niedzwetzkyana* Dieck): evaluation and breeding prospects. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2020;181(3):64-69. [in Russian] (Барсукова О.Н. Изучение и перспективы селекционного использования яблони Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(3):64-69). DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-64-69
- Chindyaeva L.N., Tomoshevich M.A., Belanova A.P., Banaev E.V. Woody plants in green landscaping of Siberian cities (Drevesnye rasteniya v ozelenenii sibirskikh gorodov). Novosibirsk: Geo; 2018. [in Russian] (Чиндяева Л.Н., Томошевич М.А., Беланова А.П., Банаев Е.В. Древесные растения в озеленении сибирских городов. Новосибирск: Гео; 2018).
- Churikova O.A. Conservation of apple species in the *in vitro* collection. *Breeding and Variety Cultivation of Fruit and Berry Crops*. 2019;6(2):97-99. [in Russian] (Чурикова О.А. Сохранение видов яблони в коллекции *in vitro*. *Селекция и сорторазведение садовых культур*. 2019;6(2):97-99).
- Harris S.A., Robinson J.P., Juniper B.E. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*. 2002;18(8):426-430. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02689-6
- Ji X.H., Wang Y.T., Zhang R., Wu S.J., An M.M., Li M. et al. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2015;120(1):325-337. DOI: 10.1007/s11240-014-0609-y
- Jiang H., Zhou T., Fan J., Zhang D., Zhang L., Sun Y. et al. 'Yangzhi Yu': a double-flowered ornamental crabapple. *HortScience*. 2020;55(4):589-590. DOI: 10.21273/HORTSCI14677-19
- Kakimzhanova A.A., Dyussebekova D., Nurtaza A. Yessimseitova A.K., Shevtsov A., Lutsay V. et al. An efficient micropropagation system for the vulnerable wild apple species, *Malus sieversii*, and confirmation of its genetic homogeneity. *Erwerbs-Obstbau*. 2023;65(5):621-632. DOI: 10.1007/s10341-022-00720-8
- Khanbabaeva O.E., Levko G.D., Kukurichkin G.M. Creation of bioresource collections generic decorative complexes herbaceous plants in botanical gardens and research institutions. In: A.A. Isaev (ed.). *Safe North – Clean Arctic: Proceedings of the V All-Russian (with international attendance) Scientific and Practical Conference, April 13–14, 2023, Surgut (Bezopasny Sever – chistaya Arktika: sbornik materialov V Vserossiyskoy (s mezhdunarodnym uchastiyem) nauchno-prakticheskoy konferentsii, 13–14 aprelya 2023 g., Surgut)*. Surgut; 2023. p.329-331. [in Russian] (Ханбабаева О.Е., Левко Г.Д., Кукуричкин Г.М. Создание биоресурсных коллекций родовых комплексов декоративных травянистых растений в ботанических садах и научно-исследовательских учреждениях. В кн.: *Безопасный Север – чистая Арктика: сборник материалов V Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции, 13–14 апреля 2023 г., Сургут* / под ред. А.А. Исаева. Сургут, 2023. С.329-331).
- Khlestkina E.K. Genetic resources in Russia: from collections to bioresource centers. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(1):9-30. [in Russian] (Хлесткина Е.К. Генетические ресурсы России: от коллекций к биоресурсным центрам. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(1):9-30). DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-9-30
- Lechner M.P. Introduction apple (*Malus* Mill.) in the Kuzbass Botanical Garden *Botanical Research of Siberia and Kazakhstan*. 2019;(25):98-101. [in Russian] (Лехнер М.П. Интродукция яблони (*Malus* Mill.) в Кузбасском ботаническом саду. *Ботанические исследования Сибири и Казахстана*. 2019;(25):98-101).
- Likhonos F.D. [A survey of species in the genus *Malus* Mill. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1974;52(3):16-34. [in Russian] (Лихонос Ф.Д. Обзор видов в роде *Malus* Mill. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1974;52(3):16-34).
- Liu Y.N. Studies of standard description and database construction of *Malus* cultivars. Beijing: Chinese Academy of Forestry; 2018. [in Chinese]
- Magyar-Tábori K., Dobránszki J., Teixeira da Silva J., Bulley S., Hudak I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2010;101(3):251-267. DOI: 10.1007/s11240-010-9696-6
- Matushkina O.V., Pronina I.N. New in the *in vitro* technology of fruit crops (Novoye v tekhnologii *in vitro* plodovyykh kultur). *Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2008;18:224-232. [in Russian] (Матушкина О.В., Пронина И.Н. Новое в технологии *in vitro* плодовых культур. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2008;18:224-232).
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nurtaza A., Karimova V., Magzumova G., Muranets A., Kakimzhanova A. Effect of pH, light intensity, and fertilizers on acclimatization of endangered rooted plantlets *Malus niedzwetzkyana* for restoration in nature. *Journal of Plant Nutrition*. 2023;46(12):2850-2864. DOI: 10.1080/01904167.2022.2160756
- Nurtaza A., Karimova V., Magzumova G., Muranets A., Kakimzhanova A. The future of walnut–fruit forests in Kyrgyzstan and the status of the iconic Endangered apple *Malus niedzwetzkyana*. *Oryx*. 2019;53(3):415-423. DOI: 10.1017/S0030605318001230
- Papikhin R., Muratova S., Dubrovsky E., Grigoryeva M. Development of methods for introducing hybrid progeny of *Malus sieboldii* Rehd. at *in vitro* conditions. *E3S Web of Conferences*. 2020;210:06024. DOI: 10.1051/e3sconf/202021006024
- Romadanova N., Mishustina S., Matakova G., Rakhimbaev I., Kushnarenko S. *In vitro* culture initiation and micropro-

- pogation of perspective cultivars, rootstocks and wild forms of *Malus*. *Известия, результаты и исследования*. 2013;3(059):142-149. [in Russian] (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. *Известия, результаты и исследования*. 2013;3(059):142-149).
- Romadanova N.V., Vecherko N.A., Zhumabekov E.Zh. Conservation of the apple-tree gene pool in an *in vitro* collection (Sokhraneniye genofonda yabloni v kollektzii *in vitro*). In: A.S. Demidov (ed.). Biotechnology as a Tool for Plant Biodiversity Conservation – 2008: Proceedings of the II All-Russian Scientific and Practical Conference, Belgorod, August 19–21, 2008 (*Biotekhnologiya kak instrument sokhraneniya bioraznoobraziya rastitel'nogo mira – 2008: materialy II Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Belgorod, 19–21 avgusta 2008 g.*). Belgorod; 2008. p.128-132. [in Russian] (Ромаданова Н.В., Вечерко Н.А., Жумабеков Е.Ж. Сохранение генофонда яблони в коллекции *in vitro*. *Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира – 2008: материалы II Всероссийской научно-практической конференции, Белгород, 19–21 августа 2008 г.* / под ред. А.С. Демидова. Белгород; 2008. С.128-132).
- Uchendu E.E., Paliyath G., Brown D.C., Saxena P.K. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2021;47:710-718. DOI: 10.1007/s11627-011-9379-y
- Vasil'eva I.S., Paseshnichenko V.A., Udalova Z.V., Zinov'eva S.V. Steroid furostanol glycosides: a new class of natural adaptogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(5):463-472. DOI: 10.1134/S0003683809050019
- Vasilyeva O.Yu., Dorogina O.V., Kuban I.N., Sarlaeva I.Ya., Buglova L.V. Methodical aspects of studying of biore-source collections of rare and economic valuable plants. *Horticulture and Viticulture*. 2018;4(214):12-18. [in Russian] (Васильева О.Ю., Дорогина О.В., Кубан И.Н., Сарлаева И.Я., Буглова Л.В. Методические аспекты изучения биоресурсных коллекций редких и хозяйственно ценных растений. *Садоводство и виноградарство*. 2018;4(214):12-18). DOI: 10.31676/0235-2591-2018-4-12-18
- Vstovskaya T.N., Koropachinsky I.Yu. Woody plants in the Central Siberian Botanical Garden (Drevesnye rasteniya Tsentralnogo sibirskogo botanicheskogo sada). Novosibirsk: Geo; 2005. [in Russian] (Встовская Т.Н., Коропачинский И.Ю. Древесные растения Центрального сибирского ботанического сада. Новосибирск: Гео; 2005).
- Wang N., Zheng Y., Duan N., Zhang Z., Ji X., Jiang S. et al. Comparative transcriptomes analysis of red- and white-fleshed apples in an F1 population of *Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana* crossed with *M. domestica* 'Fuji'. *PLoS One*. 2015;10(7):0133468. DOI: 10.1371/journal.pone.0133468
- Yang M., Che S., Zhang Y., Song W., Yan G., Yu W. *Malus niedzwetzkyana* (Dieck) Langenf. transcriptome comparison and phylogenetic analysis with *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2020;67(3):313-323. DOI: 10.1007/s10722-019-00871-w

### Информация об авторах

**Анастасия Петровна Беланова**, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, Новосибирский государственный аграрный университет, 630039 Россия, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, boronina.a@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8525-0177>

**Юлианна Геннадьевна Зайцева**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, ulianna\_zaitseva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9413-4664>

**Елена Михайловна Лях**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, llyakh@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4692-7042>

### Information about the authors

**Anastasia P. Belanova**, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, Novosibirsk State Agrarian University, 160 Dobrolyubova St., Novosibirsk 630039, Russia, boronina.a@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8525-0177>

**Yulianna G. Zaytseva**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, ulianna\_zaitseva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9413-4664>

**Elena M. Lyakh**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia, llyakh@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4692-7042>

**Вклад авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Contribution of the authors:** the authors contributed equally to this article.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 27.02.2024; одобрена после рецензирования 26.06.2024; принята к публикации 04.09.2024. The article was submitted on 27.02.2024; approved after reviewing on 26.06.2024; accepted for publication on 04.09.2024.