

Impact Factor:

ISRA (India) = 3.117
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
PIHII (Russia) = 0.156
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

SOI: [1.1/TAS](#) DOI: [10.15863/TAS](#)

International Scientific Journal Theoretical & Applied Science

p-ISSN: 2308-4944 (print) e-ISSN: 2409-0085 (online)

Year: 2019 Issue: 05 Volume: 73

Published: 30.05.2019 <http://T-Science.org>

QR – Issue



QR – Article



Shoira Jamshidovna Isroilova
Department of “Biotexnology”
Tashkent chemical technological institute
Tashkent, Uzbekistan

SECTION 9. Chemistry and chemical
technology.
UDK 542

IN VITRO MICROCLONAL MULTIPLICATION OF FRUIT CULTURES

Abstract: The review is focused on principal stages and methods of in vitro clonal micropropagation of fruit cultures. Special emphasis is laid on auxiliary bud propagation technique and method of adventitious shoot regeneration from leaf explants of sour cherry, cherry, peach and apricot. Some aspects of plant material testing for virus infections have been reviewed as well as certain problems of genetic stability preservation depending on propagation model.

Key words: micropropagation, in vitro, rhizogenesis, explant, micro sprout.

Language: Russian

Citation: Isroilova, S. J. (2019). In vitro microclonal multiplication of fruit cultures. *ISJ Theoretical & Applied Science*, 05 (73), 531-535.

Soi: <http://s-o-i.org/1.1/TAS-05-73-81> **Doi:**  <https://dx.doi.org/10.15863/TAS.2019.05.73.81>

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Аннотация: В работе представлен обзор, в котором рассматриваются особенности методов микроклонального размножения плодовых культур в системе

in vitro. Особое внимание уделено методу размножения пазушными почками и методу регенерации адвентивных побегов из листовых эксплантов вишни, черешни, персика и абрикоса. Рассмотрены вопросы оздоровления растений от различных патогенов и тестирования растительного материала плодовых культур на наличие вирусных инфекций.

Ключевые слова: микроразмножения, in vitro, ризогенез, эксплант, микропобег.

Введение

Впервые микроклональное размножение провел французский ученый Жорж Морель на орхидеях в 50-х годах XX века. В своих работах он использовал технику культивирования апикальной меристемы растений. Растения, полученные таким образом, были свободны от вирусной инфекции.

Микроклональное размножение — получение *in vitro* растений, генетически идентичных исходному экспланту (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*). В основе микроразмножения лежит уникальное свойство соматической растительной клетки — тотипотентность — способность клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма [2].

В настоящее время все большую актуальность приобретают различные методы микроклонального размножения сельскохозяйственных культур (прежде всего вегетативно размножаемых) в системе *in vitro*: размножение пазушными и адвентивными почками, непрямои морфогенез, соматический эмбриогенез.

Использование этих методов дает возможность:

— ускорять селекционный процесс, в результате этого сроки получения товарной продукции сокращаются до 2–3 лет вместо 10–12;

— получать за короткий срок большое количество оздоровленного, безвирусного материала, генетически идентичного материнскому растению;

Impact Factor:

ISRA (India) = 3.117
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.156
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

– работать в лабораторных условиях и поддерживать активно растущие растения круглый год;

– размножать растения практически без контакта с внешней средой, что исключает воздействие неблагоприятных абиотических и биотических факторов;

– получать максимальное число растений с единицы площади;

– в короткий срок получать большое число растений трудно размножаемых или вегетативно не размножаемых;

– при выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно ускорить переход от ювенильной к репродуктивной фазе развития;

– длительно (в течение 1–3 лет) сохранять растительный материал в условиях *in vitro* (без пассирования на свежую среду) [3, 4],

– создавать банки длительного хранения ценных форм растений и отдельных их органов;

– разрабатывать методы криосохранения оздоровленного *in vitro* материала [5, 6].

Этапы микроклонального размножения косточковых плодовых культур и тестирование на наличие вирусных инфекций

Процесс микроклонального размножения включает несколько этапов. Основными из них являются [7–10]:

1-й этап — введение экспланта в культуру *in vitro*; 2-й этап — микроразмножение;

3-й этап — процесс укоренения микропобегов; 4-й этап — осуществление выхода укорененных растений из стерильных условий в нестерильные.

Важным этапом в методике микроразмножения растений *in vitro* является выращивание безвирусных маточных форм растений в вегетационных домиках или изолированных боксах в зимних теплицах, в условиях, недоступных для переносчиков вирусов. Растения-доноры эксплантов для последующего введения в культуру *in vitro* должны быть протестированы на наличие вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций с помощью методов ПЦР-диагностики либо молекулярной гибридизации, либо иммуноферментного анализа (ИФА) [10, 11].

Метод ИФА позволяет в сжатые сроки выявлять подавляющее большинство вирусов, заражающих косточковые культуры: вирусы карликовости сливы, некротической кольцевой пятнистости косточковых, потивирус шарки слив, не повирussy скручивания листьев черешни. Клоны, оказавшиеся свободными от контактных вирусов по результатам проверки методом ИФА, подвергают затем основному тестированию, включающему серологические тесты в сочетании

с тестом на растениях-индикаторах. Растениям, оказавшимся по результатам тестирования свободными от вирусов и других регламентированных патогенов, присваивается категория «безвирусных» базисных клонов. В случае выявления инфекции исходные растения могут подвергнуться оздоровлению. Для оздоровления растений косточковых культур от вирусов наиболее целесообразно сочетать методы суховоздушной термотерапии и культуры *in vitro*. Если с помощью культуры изолированных апикальных меристем не удастся освободиться от тестируемых вирусов, используют методы хемотерапии, основанные на введении в питательные среды химических веществ, ингибирующих развитие вирусной инфекции в растениях *in vitro* [11].

Иногда для активного выявления бактериальной микрофлоры среды обогащают различными органическими добавками, например гидролизатом казеина, который провоцирует развитие сапрофитных микроорганизмов [7, 12–14]. Оценку зараженности проводят визуально через 7–10 дней. «Чистые» экспланты помещают на питательные среды для дальнейшего культивирования. Практикуют на этой ступени и применение сред, лишенных ростовых веществ [7, 15].

Введение в культуру *in vitro* и микроразмножение плодовых косточковых культур

При клональном микроразмножении плодовых косточковых культур в качестве источника эксплантов обычно используют верхушечные и боковые почки, а также меристематические верхушки. Вычленение верхушечной меристемы проводят по общепринятым методикам после ступенчатой стерилизации растительного материала [13, 16].

Для микроклонального размножения косточковых культур используют различные среды: для микроразмножения вишни — среды Пиерика, Готре, Уайта, Хеллера [12, 17], для вишни и сливы — среду Розенберга, модифицированную для плодовых культур [18] и для сливы — среду Лепуавра и В5 [12, 19]. Но наиболее подходящей для микроклонального размножения вишни, черешни и сливы является питательная среда Мурасиге — Скуга (МС) [12, 16, 17, 19–27].

В зависимости от этапа микроклонального размножения плодовых косточковых культур к питательным средам добавляют 6-бензиламинопури (6-БАП) в концентрациях 0,2–2 мг/л [5, 8, 13, 17, 20,]. На этапе введения в культуру *in vitro* используют более низкую концентрацию цитокинина — 0,2 мг/л БАП [8, 20, 27]. Для индукции пролиферации пазушных почек

Impact Factor:

ISRA (India) = 3.117
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.156
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

с целью получения максимального числа побегов микрорастения вишни культивируют с добавлением БАП, в концентрациях 0,5–2 мг/л [5, 8, 12, 13, 17, 20, 22], микрорастения сливы 0,5 — 1 мг/л БАП [16, 19, 20, 27].

Процесс укоренения микропобегов

Особого внимания требует этап укоренения. Процесс укоренения *in vitro* побегов плодовых косточковых культур зависит от сортовых особенностей [5, 27], от числа проведенных пассажей, от концентрации и типа ауксина, от способа его применения [21]. Для получения полностью сформированных микрорастений плодовых косточковых культур из среды исключается 6-БАП, препятствующий процессам ризогенеза, и в среды вводятся ауксины, в основном — \square -индолил-3-масляная кислота (ИМК) [5, 8, 10, 13, 16, 18, 22, 26, 27]. Установлено, что оптимум концентраций ИМК в составе питательной среды находится в пределах 0,5–1 мг/л [8, 17, 18, 20, 21, 27, 31–33]. Присутствие в среде ИМК в концентрации 2 мг/л вызывает образование гипертрофированных корней [17, 27].

Совместное введение в среду для укоренения препарата рибав (1 мл/л) и традиционных фитогормонов ауксинов [ИМК и \square -индолилуксусной кислоты (ИУК) по 0,5 мг/л каждого] повышает процент укоренения побегов ряда сортов косточковых культур [12].

При сравнительном изучении индукторов корнеобразования: ИМК, ИУК и \square -нафтилуксусной кислоты (НУК), была выявлена высокая эффективность ИУК в концентрации 6,0 мг/л [27]. Наибольшее число укоренившихся микрочеренков вишни было получено на среде, содержащей НУК [8, 17]. Однако при этом на базальном участке побегов происходило интенсивное разрастание каллуса, что затрудняло перенос пробирочных растений с корнями в нестерильные условия.

Для эффективного укоренения пробирочных растений косточковых культур большое значение имеет не только тип стимулятора, но и способ его аппликации. Помимо введения ауксинов в питательную среду, для индукции ризогенеза используют предварительное замачивание побегов в стерильном водном растворе ИМК (25–30) мг/л при экспозиции 12–24 часа [8, 12, 13, 17, 20]. Проведенные эксперименты показали, что обработка микрочеренков водным раствором ИМК более эффективна, чем введение этого регулятора в культуральную среду. Массовое появление первых придаточных корней при применении предварительной обработки индуктором ризогенеза отмечалось на 20–25 день [8, 17]. Еще одним способом индукции ризогенеза является обработка побегов плодовых

косточковых культур тальковой ауксин содержащей пудрой ИМК с концентрацией 0,125%, 0,25% [12, 20, 27] и ИУК с концентрацией 0,25%, 0,5% [27]. При использовании гормональной пудры отмечалась высокая эффективность и технологичность применения индукторов ризогенеза [20]. Но использование тальковой пудры ИМК с разными концентрациями ауксина выявило сортовую специфику при укоренении микрочеренков сливы [27].

Процесс ризогенеза наиболее интенсивно протекает на модифицированных средах МС и Уайта [17]. По другим данным [16, 26] лучшей средой для корнеобразования являются среды с макроэлементами по Хеллеру с добавлением витаминов и разбавленная вдвое среда МС с пониженным содержанием сахарозы 15 мг/л и с исключением мезоинозита, способствующего образованию каллусной ткани. Однако в большинстве работ для укоренения микропобегов косточковых культур используется среда Мурасиге и Скуга [16, 17, 19–23, 26, 27].

Методы микроклонального размножения

Существует несколько способов микроклонального размножения растений *in vitro*:

- методы размножения пазушными почками;
- методы размножения адвентивными почками;
- непрямой морфогенез;
- соматический эмбриогенез.

Для любого типа регенерации *in vitro* можно выделить четыре группы факторов, определяющих ее успех: генотип и состояние исходного родительского растения; условия и методы культивирования; состав питательных сред; особенности введения экспланта в стерильную культуру [1].

Влияние генотипа на эффективность микроразмножения

Наиболее существенное влияние на эффективность микроразмножения оказывает генотип. Реакция растений на условия асептического культивирования зависит от сортовых особенностей и объясняется разной регенерационной способностью сортов плодовых и ягодных культур [25]. Например, при использовании метода клонального микроразмножения для ускоренного размножения новых сортов вишни сортовые особенности оказались доминирующими факторами в способности растений к микроразмножению. Сортовые различия проявлялись как на стадии пролиферации, так и на стадии корнеобразования [5].

Impact Factor:

ISRA (India) = 3.117
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.156
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

Среди эксплантов разных сортов одного и того же вида плодовых растений нередко наблюдается разная степень проявления реакции на включаемые в среду регуляторы роста, что, видимо, отражает, в какой-то мере эндогенное содержание ростовых веществ, которое является генетически обусловленным признаком вида или сорта. В то же время реализация морфогенетического потенциала в культуре зародышей *in vitro*, у гибридов между видами *Cerasus vulgaris*, *C. maackii*, *C. fruticosa*, *Padus racemosa* в основном определялась генотипом и в меньшей степени зависела от состава питательной среды.

Условия культивирования

Еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения растений, являются условия их культивирования. Оптимальными условиями культивирования косточковых плодовых культур являются: температура 22–26 °С для вишни, черешни [8, 17, 24, 26] и 26–28 °С — для сливы [20, 27], освещенность 2000–5000 лк — для вишни,

черешни [8, 10, 17, 25, 26] и 3500 лк для сливы [19, 20, 27] при 16-часовом фотопериоде. Микрорастения должны выращиваться в климатических камерах или в комнатах с регулируемым режимом.

Необходимо отметить, что у сортов вишни на этапе пролиферации увеличение коэффициента размножения и повышение доли побегов, пригодных к укоренению, может обеспечить прием чередования минеральных составов питательных сред и использование ламп синего света (ЛП 1) [12]. Большое количество побегов косточковых культур — до 30 — может образовываться при горизонтальной ориентации регенерантов [22]. Для увеличения коэффициента размножения в первых пассажах конгломераты почек и побегов косточковых культур можно не разделять на отдельные единицы, а переносить на свежую питательную среду целиком. При использовании этого приема величина коэффициента размножения резко возрастает и может достигать 40–70 за пассаж в зависимости от сорта [13].

References:

1. Polevoy, V. V., et al. (2001). *Praktikum po rostu i ustoychivosti rasteniy*: Uchebnoe posobie. (p.208). SPb..
2. Sorokina, I. K., Starichkova, N. I., Reshetnikova, T. B., & Grin', N. A. (2002). *Osnovy biotekhnologii rasteniy*. Kul'tura rastitel'nykh kletok i tkaney: Uchebnoe posobie, (p.45).
3. Chernets, A. M., Abramenko, N. M., & Stakanova, R. V. (1988). *Razrabotka metoda dlitel'nogo khraneniya in vitro bezvirusnykh klonov plodovykh porod i zemlyaniki*. Tezisy dokladov mezhdunarodnoy konferentsii: Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya. Novosibirsk.
4. Romanova, N. P., Ul'yanova, E. K. (1990). K voprosu o khraneni meriklonov zemlyaniki in vitro. *Nauchno-tekhnicheskii byulleten' Nauchno-issledovatel'skogo instituta rasteniyevodstva imeni N. I. Vavilova. L., Vyp. 204*, pp.75–79.
5. Orlova, S. Y. (2002). *Biologicheskie osobennosti i selektsionnaya tsennost' sortov vishni v usloviyakh severo-zapada Rossii*: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. (p.20). SPb..
6. Niino, T., Tashiro, K., Suzuki, M., Ohuchi, S., Magoshi, J., & Akihama, T. (1997). Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Scientia Horticulturae, Vol. 70*, pp.155–163.
7. Vysotskiy, V. A. (1983). Kul'tura izolirovannykh tkaney i organov plodovykh rasteniy: ozdorovlenie i mikroklonal'noe razmnnozhenie. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya: Ezhemesyachnyy nauchno-teoreticheskiy zhurnal, M., № 7*, pp. 42–47.
8. Faustov, V. V., Oleshko, E. V., Zharkova, I. V., Asadulaev, Z. M., Sharafutdinov, K. V., & Ismail, K. (1988). Mikroklonal'noe razmnnozhenie vishni. *Izvestiya TSKhA, M., Vypusk 5*, pp.131–148.
9. (1989). *Biotekhnologiya rasteniy: kul'tura kletok*. Per. s angl. V. I. Negruka / Pod red. R. G. Butenko (Eds.). (p.233). Moscow.
10. Demenko, V. I., & Trushechkin, V. G. (1983). Razmnnozhenie vishni metodom in vitro. *Sel'sko-khozyaystvennaya biologiya: Ezhemesyachnyy nauchno-teoreticheskiy zhurnal, M., № 7*, pp. 51–53.
11. Kashin, V. I., et al. (2001). *Tekhnologicheskiy protsess polucheniya bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovykh i yagodnykh kul'tur*: Metodicheskie ukazaniya. (p.97). Moscow.

Impact Factor:

ISRA (India) = 3.117
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
PIIHU (Russia) = 0.156
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

12. Shipunova, A. A. (2003). *Klonal'noe mikrorazmnozhenie plodovykh rasteniy*: Avtoref. dis. ... kand. sel'skokhozyaystvennykh nauk. (p.24). Moscow.
13. Trushechkin, V. G., Vysotskiy, V. A., & Oleshko, E. V. (1983). *Mikroklonal'noe razmnozhenie sortov i podvoev kostochkovykh kul'tur*: Metodicheskie ukazaniya. (p.16). Moscow.
14. Lane, W. D. (1979). Regeneration of pear plants from shoot meristem tips. *Plant Sci. Letters*, Vol. 16, № 2/3, pp.337–342.
15. Fossard, R. A., & Bourne, R. A. (1977). Reducing tissue culture costs for commercial propagation. *Tissue culture for horticultural purposes*. *Acta Hort*, Vol. 78, pp. 37–44.
16. (2005). *Metodicheskie rekomendatsii po ispol'zovaniyu biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, yagodnymi i dekorativnymi kul'turami*. Pod red. E. N. Dzhigadlo (Eds.). (p.50). Orel.
17. Oleshko, E. V. (1985). *Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya podvoev i sortov vishni*: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. (p.15). Moscow.
18. Khaak, E. R., & Nuust, Y. O. (1989). Klonal'noe mikrorazmnozhenie kostochkovykh kul'tur. *Sadovodstvo i vinogradarstvo, M.*, № 1, pp. 27–29.
19. Dudchenko, O. P. (1988). *Regeneratsiya v kul'ture izolirovannykh meristem slivy*. Tezisy dokladov Mezhdunarodnoy konferentsii «Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya 2». (p.358). Novosibirsk.
20. Kornatskiy, S. A., Vysotskiy, V. A., & Trushechkin, V. G. (1991). *Problemy klonal'nogo mikrorazmnozheniya kostochkovykh kul'tur*. Dostizheniya v plodovodstve v Nechernozemnoy zone RSFSR: Sb. nauch. trudov. (pp.104–116). Moscow.
21. (1996). *Induktsiya morfogeneza i tkanevaya selektsiya plodovykh i yagodnykh kul'tur*: Metodicheskie rekomendatsii. Pod red. V. E. Perfil'eva (Eds.). p.73.
22. Svitaylo, A. M., Bondarenko, P. E., & Shevchuk, N. S. (1988). *Klonal'noe mikrorazmnozhenie podvoev i sortov plodovykh kul'tur*. Tezisy dokladov Mezhdunarodnoy konferentsii «Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya 2». (p.346). Novosibirsk.
23. Burgos, L., & Albuquerque, N. (2003). Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports*, Vol. 21, pp.1167–1174.
24. Hammatt, N., & Grant, N. J. (1998). Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports*, Vol. 17, pp. 526–530.
25. Grant, N. J., & Hammatt, N. (2000). Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves. *New Forests. Netherlands*, Vol. 20, pp. 287–295.
26. James, D. E., Posseu, A. J., & Malhotro, S. B. (1984). Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, Vol. 3, № 4.
27. Tyulenev, V. M., Naftaliev, N. M., Osipova, L. V., & Rastorguev, S. L. (1988). *Klonal'noe mikrorazmnozhenie tsennykh genotipov plodovykh kul'tur*. Tezisy dokladov Mezhdunarodnoy konferentsii «Biologiya kul'tiviruemykh kletok i biotekhnologiya 2». (p.320). Novosibirsk.