

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття**

**\_\_\_\_\_ Кваско О.Ю.  
“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.**

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему: Мікророзмноження в культурі *in vitro* яблуні райської *Malus pumila*

---

---

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

**Гарант освітньої програми  
к.б.н., доцент**

\_\_\_\_\_ **Кваско О.Ю.**

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи  
д.с.-г.н., професор**

\_\_\_\_\_ **Коломієць Ю.В.**

**Виконав**

\_\_\_\_\_ **Манько І.А.**

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття

Кваско О.Ю.

“ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**З А В Д А Н Н Я**

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Маньку Іллі Андрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи Мікророзмноження в культурі *in vitro* яблуні  
райської *Malus pumila*

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024 р. №1880 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 р.

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи

Живильні середовища, регулятори росту, насіння, перліт, проростки, стратифікація,  
яблуні райської *Malus pumila*

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Пророщування насіння яблуні райської Ред Сентинел для введення в культуру *in vitro*

2. Одержання стерильних проростків яблуні райської Ред Сентинел

3. Перевірка рослин-регенерантів яблуні райської Ред Сентинел на присутність ендofітної  
мікрофлори

Перелік графічних документів таблиці, рисунки

Дата видачі завдання “01” вересня 2024 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Коломієць Ю.В.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

Манько І.А.

(підпис) (прізвище та ініціали студента)

## Реферат

Бакалаврська кваліфікаційна робота виконана на 46 сторінках, містить 6 рисунків, 6 таблиць, 51 джерело цитованої літератури.

Метою нашої роботи було отримання асептичних рослин в культурі *in vitro* яблуні райської *Malus pumila* та проведення мікроклонального розмноження рослин-регенерантів.

В результаті проведених досліджень було отримано асептичні рослини в культурі *in vitro* яблуні райської *Malus pumila* та проведено мікроклональне розмноження рослин-регенерантів яблуні райської Ред Сентинел.

Встановлено, що для мікророзмноження в культурі *in vitro* яблуні райської Ред Сентинел ефективний метод стратифікації насіння в перліті протягом 6 тижнів. В середньому лабораторна схожість насіння яблуні райської Ред Сентинел становила 90%.

Для отримання стерильних рослин-регенерантів в культурі *in vitro* яблуні райської Ред Сентинел ефективною була стерилізація проростків розчином Білизни в концентрації 1:3 протягом 10 хвилини. Відмічено високий відсоток одержання асептичних рослин без ектофітної інфекції.

Коефіцієнт мікроклонального розмноження яблуні райської Ред Сентинел на модифікованому середовищі МС, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ІМК, становив 3,2.

## ЗМІСТ

Вступ .....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1. Стан та перспективи вирощування яблуні в культурі <i>in vitro</i> ...	7
1.2. Розмноження яблуні <i>in vitro</i> .....	10
1.3. Інфекція та дезінфекція експлантатів, а також потемніння, спричинене пораненням .....	12
1.4. Тип експлантату: звичайні експлантати або тонкі клітинні шари .....	15
1.5. Вплив складових живильного середовища на мікроклональне розмноження яблуні .....	17
1.5.1. Регулятори росту рослин .....	17
1.5.2. Джерело вуглеводів .....	20
1.5.3. Гелеутворювачі .....	21
1.6. Укорінення та акліматизація .....	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	27
2.1. Об'єкт дослідження .....	29
2.2. Одержання молодих проростків яблуні райської Ред Сентинел	29
2.3. Введення в культуру яблуні райської Ред Сентинел .....	29
2.4. Тест на ендofітну інфекцію .....	30
2.5. Мікроклональне розмноження яблуні райської Ред Сентинел .	30
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	33
3.1. Пророщування насіння яблуні райської Ред Сентинел для введення в культуру <i>in vitro</i> .....	33
3.2. Одержання стерильних проростків яблуні райської Ред Сентинел .....	35
3.3. Перевірка рослин-регенерантів яблуні райської Ред Сентинел на присутність ендofітної мікрофлори .....	38
ВИСНОВКИ .....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	42

## ВСТУП

Мікророзмноження яблуні відіграло важливу роль у одержанні здорових, безвірусних рослин та у швидкому розмноженні пагонів та підщеп з бажаними ознаками. Протягом останніх кількох десятиліть для яблуні було розроблено багато надійних методів як для підщеп, так і для погонів з практичної, комерційної точки зору. На успішне мікророзмноження яблуні з використанням вже існуючих меристем (культура верхівкових меристем або вузлових сегментів) впливають кілька внутрішніх та зовнішніх факторів, включаючи умови *ex vitro* (наприклад, генотип та фізіологічний стан) та *in vitro* (наприклад, складові середовища та світло).

Яблуна є одним з найважливіших фруктів у помірних зонах і третьою за важливістю фруктовую культуру (64,3 млн т/рік) у світі після бананів (81,3 млн т/рік) та винограду (66,3 млн т/рік) (ФАО, 2019).

Яблуна традиційно розмножується вегетативними методами, такими як брунькування чи щепленням. Хоча ці традиційні методи розмноження не гарантують здоров'я рослин та відсутність хвороб, вони залежать від сезону; крім того, вони зазвичай призводять до низьких показників розмноження. Мікророзмноження підщеп яблуні відкрило нові галузі досліджень та розмноження плодових дерев, дозволяючи подолати проблеми традиційних методів та забезпечуючи швидке розмноження плодових рослин, вільних від хвороб, у комерційних масштабах [3]. Крім того, мікророзмноження дозволяє селекціонерам яблуні швидко розмножувати нові сорти, селекційні лінії чи варіанти. Це важливий крок до успішної регенерації трансгенних ліній та визначає ефективність протоколу трансформації [5].

Історія культури тканин яблуні сягає кінця 1960-х та початку 1970-х років, коли погони яблуні культивували *in vitro*, і вперше було зареєстровано їх аксенічний ріст [15, 18]. Відтоді багато генотипів було успішно культивовано *in vitro* і було опубліковано ряд статей про різні аспекти мікророзмноження яблуні. Крім того, були розроблені надійні методи як для підщеп, так і для погонів з дослідницької та комерційної точок зору.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Стан та перспективи вирощування яблуні в культурі *in vitro*

Сьогодні площі дикорослих яблуневих лісів скоротилися до менш ніж 20% від рівня 1960-х років ХХ століття. Це негативно впливає на стабільність біосфери та призводить до втрати багатьох рідкісних, цінних, реліктових і, особливо, ендемічних видів флори та фауни.

Яблуня (лат. *Malus*) – рід листопадних дерев і кущів родини трояндових (*Rosaceae*) з кулеподібними солодкими чи кисло-солодкими плодами, що включає 62 види (за даними 2013 року). Її плоди широко використовуються як у харчуванні, так і в лікувальних цілях. Деревина яблуні має добрі технічні якості, а багато видів вирощуються як декоративні. Крім того, яблуні активно застосовуються в захисному лісорозведенні. Всі представники роду є гарними медоносами.

Найбільш поширеними видами є яблуня домашня (культурна) — *Malus domestica*, яблуня сливолиста (*Malus prunifolia*) та яблуня низька (*Malus pumila*). Їх вирощують у регіонах з помірним кліматом. Серед провідних світових виробників яблук – Німеччина, Італія, Франція, Іспанія, Китай, Японія, США, Канада, Аргентина, Чилі, Австралія, Нова Зеландія та Південно-Африканська Республіка. Основними причинами низьких врожаїв є відсутність інтенсивних технологій оздоровлення та вирощування якісного посадкового матеріалу. Сади часто уражені бактеріальними, грибуими та вірусними інфекціями.

Яблука (*Malus spp.*) є однією з найцінніших плодових культур і широко вирощується у всьому світі [1]. У 2019 році загальна площа посівів яблук у світі становила 4,7 млн гектарів, що дало близько 87 млн тонн, що являє собою збільшення виробництва на 35%, незважаючи на скорочення зібраної площі на 16% порівняно з 1999 роком [2]. Це збільшення продуктивності пояснюється головним чином використанням систем посадки з більшою

щільністю, що стало можливим завдяки використанню карликових підщеп [3, 4].

Веgetативно розмножені підщепи яблуні мають переваги над традиційними розсадними підщепами, оскільки вони послідовно надають пагонам такі ознаки, як карликовий ріст, однорідна архітектура рослини, покращення якості плодів та засвоєння поживних речовин, стійкість до хвороб та толерантність до біотичного та абіотичного стресу [5-9]. Програма селекції Корнельського університету (англ. Cornell University) – приватний університет, розташований в місті Ітака (штат Нью-Йорк, США) розробила кілька карликових підщеп, стійких до хвороб та шкідників, а також забезпечують ранню та стабільну врожайність плодів [10-14]. Однак, селекція нових підщеп яблуні з диких видів яблуні також привела до сприйнятливості до вірусних та вірусоподібних захворювань, причому гіперчутливі реакції спостерігаються в серіях підщеп Женева, G. 16, G. 814 та G. 935 [14-17]. Існують варіації в чутливості до вірусів та віроїдів у підщепах серії Женева, але генетична основа цієї стійкості невідома [5].

Віруси є збудниками багатьох небезпечних хвороб яблуні, проявляються у вигляді зміни забарвлення листя, патологічних новоутворень, затримки росту та пробудження бруньок. Передаються через сік інфікованих рослин при щепленні чи обрізанні, пилок, насіння, комах і ґрунтових нематод. Інфіковане дерево залишається хворим усе життя, тому вірусні захворювання мають хронічний характер. Використання хворих живців сприяє поширенню інфекції. Віруси послаблюють стійкість рослин і знижують продуктивність, що викликає значні економічні збитки в усьому світі, тому надзвичайно важливим є їхнє раннє виявлення [6].

Сучасний напрямок це вирощування оздоровлених рослин *in vitro*. Для створення здорового посадкового матеріалу необхідно мати достатню кількість стерильних *in vitro* рослин. На першому етапі важливими є правильний вибір експлантів, стерилізація та умови культивування. Для введення в культуру використовують:

1. Зелені пагони з лабораторно пророщених зимових черешків;
2. Зелені пагони, зрізані у польових умовах;
3. Пагони, пророщені з насіння дикорослих яблунь;
4. Зародкові пагони з насіння.

Взимку (січень–березень) зрізають однорічні пагони (20–30 см), промивають, стерилізують хлорвмісними розчинами (наприклад, «Білизна»), потім пророщують у воді або у слабких живильних розчинах. Відібрані пагони додатково стерилізують 0,1% сулемою ( $\text{HgCl}_2$ ). Для польових пагонів час стерилізації подовжується через вищу зараженість [8].

Після стерилізації апекси переносять у рідке середовище Мурасіге-Скуга (МС) без агару, оскільки фенольні сполуки, що виділяються, можуть спричинити загибель мікропагонів. Щоб уникнути некрозу, живильне середовище щодня замінюють. Пагони утримують на поверхні за допомогою фільтрувального паперу. Через 1,5–3 тижні отримані асептичні пагони пересаджують у тверде середовище.

Для одержання достатньої кількості оздоровлених пагонів використовують один із методів біотехнології мікроклональне розмноження.

На першому етапі пагони перевіряють на наявність інфекцій, які не завжди видно візуально. Для цього використовують середовище 523, що містить сахарозу, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт та інші компоненти. У разі прозорості середовища експлант вважають чистим, при помутнінні – зараженим [13].

У випадку повторного зараження або наявності стійкої бактеріальної флори застосовують хемотерапію з антибіотиками (ампіцилін, гентаміцин, цефотаксим тощо), але їх слід застосовувати обмежено та короткочасно. Альтернативою є використання Plant Preservative Mixture (PPM), який ефективно пригнічує ріст патогенів без формування стійких штамів. Дослідження ефективності PPM для яблуні тривають.

## 1.2. Розмноження яблуні *in vitro*

Розмноження яблуні *in vitro* зазвичай включає чотири стадії, як і в інших видів рослин:

- 1 – створення культур *in vitro* з рослин *in vivo*;
- 2 – регенерація та/або розмноження пагонів;
- 3 – укорінення мікропагонів;
- 4 – акліматизація рослин *in vitro* та приживлення рослини у середовищі *in vivo*.

Найчастіше використовуваними експлантатами на стадії 1 розмноження яблуні *in vitro* є верхівки пагонів або пазушні бруньки при розмноженні пазушними або кінцевими бруньками, або листя, коли розмноження базується на додаткових погонах. Ранні дослідження часто ускладнювалися побурінням тканин, спричиненим окисленням поліфенолів через пошкодження під час створення культури *in vitro* [14]. Зменшити потемніння тканин можливе шляхом визначення години збирання експлантатів, додавання антиоксидантів до середовища для культивування, таких як аскорбінова кислота, активоване вугілля (АВ) або полівінілпіролідин (ПВП), окремо або в комбінації, або використання рідкої культури чи мікрощеплення [15].

Мерт та Сойлу (2010) виявили, що година початку культивування *in vitro* та використання пазушних або кінцевих кінчиків пагонів впливають на потемніння середовища під час регенерації пагонів, з широким діапазоном потемніння від 10 до 84% для трьох сортів підщеп: М9, ММ1. Верхівки меристем збирали у 3 різні моменти часу з термінальних та бічних пагонів 1-2-річних рослин у горщиках. Після поверхневої стерилізації експлантатів верхівки меристем видаляли та поміщали в пробірки, що містили середовище MS ( $1/2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$  та  $\text{KNO}_3$ ), доповнене 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> та 0,1 мг/л ІМК. Середовище для розмноження складалося з MS, доповненого 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> та 0,1 мг/л ІМК. Після двох послідовних субкультур пагони видаляли та переносили на середовище для вкорінення, що містило

MS, доповнене 0,5 мг/л ІМК. Коефіцієнти утворення пагонів з верхівок меристем були хорошими для підщеп, але час збору та джерело меристеми вплинули на ці співвідношення. Вище утворення пагонів становило 95,4% для М9 з термінальних пагонів, зібраних 8 червня, 93,3% для ММ106 з бічних пагонів та 81,2% для ММ111 з термінальних пагонів, зібраних 16 червня. Оптимальним часом збору експлантатів був час, коли пагони мають тенденцію до зниження темпів росту. Однією з головних проблем під час формування пагонів та етапів розмноження було скловування, особливо для підщепи М9. Побуріння тканин експлантатів одразу після вкорінення в середовищі або на ранній стадії розвитку пагонів також було вищим, особливо для підщепи ММ111. Загальні середні значення коефіцієнтів розмноження для підщеп були такими: 4,16 для М9, 5,33 для ММ106 та 5,74 для ММ111. Здатність пагонів до вкорінення була вищою (62,5-90,3%) для ММ106, середньою (53,6-66,6%) для М9 та низькою (12,1-40,0%) для ММ111. Виявлено, що культивування верхівок меристеми є складним з підщепою М9 та ММ111, але можливим з підщепою ММ106.

На іншому етапі розмноження пагонів можна досягти шляхом стимулювання зростання пазушних пагонів або індукції додаткових пагонів [15]. Ефективна регенерація *in vitro* є необхідною передумовою для впровадження різних біотехнологічних підходів у селекції рослин. Численні дослідження повідомляли про регенерацію із соматичних тканин яблуні, і було доведено, що на органогенез впливають кілька факторів, включаючи материнські пагони (генотип, розмір, тип та вік експлантату), умови *in vitro* (темновий період, інтенсивність та якість світла) та інші (пошкодження, орієнтація листових експлантатів). Однак одним з найважливіших факторів до та під час процесу регенерації є тип та концентрація застосованого цитокініну. Тидіазурон та бензиладенін є найчастіше використовуваними цитокінінами в системах регенерації, але їхня ефективність залежить від генотипу та інших факторів. Інші цитокініни (наприклад, зеатин та кінетин) також були протестовані в кількох експериментах, і вони виявилися загалом

менш активними. Органогенну здатність експлантатів також можна збільшити шляхом правильно підібраної попередньої обробки цитокинінами. Цитокиніни, що застосовуються під час попередньої обробки, можуть впливати на структуру листка, що, у свою чергу, може змінити регенераційну здатність листкового експлантату. Слід враховувати взаємодію між факторами попередньої обробки (гормони, світло та умови культивування) та факторами фази регенерації.

### **1.3. Інфекція та дезінфекція експлантатів, а також потемніння, спричинене пораненням**

Існує широкий спектр факторів, які необхідно враховувати під час дезінфекції рослинного матеріалу, отриманого в польових умовах або *ex vitro*, для використання в якості експлантатів для культивування *in vitro*, але деякими з найважливіших факторів є генотип, тип експлантату, процедура дезінфекції, вік та фізіологічний стан материнської рослини, а також фізичні та хімічні умови, що застосовуються *in vitro* [16].

Папрштейн та Седлак (2015) повідомили про 9% забруднених культур для сорту «James Grieve Compact», 23% для сорту «Jarka» та 25% для сорту «Mivibe», а також 2, 8 та 20% для сортів «Rubimeg», «Bohemia» та «Primadela» [17], тоді як Соні та ін. [18] зазначили, що 8% експлантів, зібраних влітку, були забруднені, тоді як експланти, зібрані навесні, восени та взимку, показали 12, 32 та 54% забруднення відповідно. Ці випадки підкреслюють важливість дезінфекції та забруднення експлантів, навіть незважаючи на те, що вже доступно багато протоколів дезінфекції. Ромаданова та ін. [19] використовували середовище 523 для виявлення грибного та бактеріального забруднення в культурі *in vitro* сортів яблуні, клональних підщеп та дикого *M. sieversii* (Ledeb. M. Roem.), виявивши 22% забруднення у лабораторно вирощених пагонах усіх сортів порівняно з 56% у польових пагонах. У їхньому дослідженні, як і слід було очікувати, рівні забруднення були обернено пропорційні розвитку або життєздатності пагонів

*in vitro*, тоді як рівні інфекції знижувалися зі збільшенням часу експозиції або концентрації HgCl<sub>2</sub>.

Рослини яблуні містять високий рівень поліфенолів [20]. За даними Вольц Р.К. та Макгі Г.К. у шкірці плодів та кірковій м'якоті 93 генотипів яблук (80 *Malus × domestica* та 13 *Malus sieversii*) протягом щонайменше 1 року між 2003 і 2005 роками, вирощених на одному місці в Новій Зеландії (NZ), було досліджено варіації концентрацій флаван-3-олу, олігомерного проціанідину, хлорогенової кислоти, дигідрохалкону, флавонолу та поліфенольних груп антоціану, а також загальних поліфенолів. Відмінності між генотипами становили 46-97% від загальної варіації концентрацій загальних поліфенолів та кожної з окремих фенольних груп у м'якоті та шкірці в обох видів, тоді як вплив року та генотипу × року був мінімальним, за винятком флавонолів шкірки у *M. × domestica* та флавонолів м'якоті в обох видів. У цих випадках відмінності між генотипами становили менше 30% від загальної варіації, що було менше, ніж варіація, виявлена для взаємодії між генотипом та роком. Загальна концентрація поліфенолів серед генотипів була розподілена в 7- та 9-кратному діапазоні в м'якоті та в 4- та 3-кратному діапазоні в шкірці відповідно, причому розкид концентрацій окремих груп поліфенолів у кожній тканині та в межах кожного виду варіювався від 2 до понад 500-кратного діапазону. Вищі концентрації зазвичай були виявлені у *M. sieversii*. У *M. × domestica* сорти та селекційні добірки, що походять з Нової Зеландії, мали нижчий середній вміст загальних поліфенолів та хлорогенової кислоти в м'якоті та шкірці, ніж старіші сорти, раніше імпортовані до Нової Зеландії з-за кордону.

Пошкодження часто призводить до побуріння експлантату яблуні, що зрештою призводить до загибелі тканини *in vitro* при вирощуванні *in vitro*. Існує кілька методів для ефективного зменшення побуріння [13]. Було виявлено, що включення 0,25% аскорбінової кислоти, 0,5% лимонної кислоти та 3 г/л активованого вугілля (АВ) до середовища зменшує побуріння підщеп яблуні MM106 та MM111 [21]. Було встановлено, що для пригнічення

утворення фенольних сполук, що вивільняються на стадії індукції, комбінацію аскорбінової та лимонної кислоти порівнювали з активованим вугіллям. Результати показали, що найкращим ініціаційним середовищем було повне середовище MS плюс комбінація аскорбінової та лимонної кислот. Культури витримували при температурі 4°C у темряві протягом шести днів, а потім переносили в кімнату для культивування з температурою 21±1°C з циклом світло/темрява 16/8 годин.

Для оптимізації швидкості розмноження застосовували обробку БАП (0, 1, 2, 4 мкМ) у поєднанні з ГКЗ (0, 3 та 6 мкМ). Середня максимальна кількість пазушних пагонів (4,8) та нових листків на регенований пагін (6) була отримана на середовищі, що містило MS + 2 мкМ БАП + 3 мкМ ГКЗ для сорту «ММ111».

Найкраще середовище для розмноження для сорту 'ММ106' містило 4 мкМ БАП, де було досягнуто середньої максимальної кількості пазушних пагонів (6) та нових листків на експлант (5,6). Коли рівень ГКЗ збільшували до 6 мкМ, максимальне збільшення висоти стебла було отримано для 'ММ111' (20,6 мм) та 'ММ106' (14 мм).

Обробка пазушних та апікальних бруньок у середовищі Мурашіге та Скуга (MS), що містило 100 мг/л аскорбінової кислоти, зменшила побуріння підщеп яблуні ММ106, М7, ММ111, М793 та М26 [22].

Додавання 0,15 г/л лимонної кислоти та 0,1 г/л аскорбінової кислоти до середовища було необхідним, щоб уникнути окислення експлантату під час приготування поперечних тонкоклітинних шарів листка (tTCL) [17].

Працюючи з яблунею 'Remo', 'Rewena' та 'Reanda', Dobránszki та ін. повідомили про успішний розвиток мікрощеплень при використанні верхівок пагонів, видалених з рослин, вирощених у польових умовах, тоді як використання верхівок пагонів *in vitro* призвело до загибелі підщеп через фенольне побуріння [18].

#### 1.4. Тип експлантату: звичайні експлантати або тонкі клітинні шари

Сегменти листя є найпоширенішими експлантатами для індукції додаткових пагонів у видів яблуні. Додаткові пагони можна індукувати безпосередньо без утворення калюсу або опосередковано через калюс [23, 24]. Павліцкі Н. показала, що формування додаткових пагонів досліджували з використанням сегментів листя пагонів, культивованих *in vitro*, підщепи яблуні Jork 9. На регенераційну здатність впливали попередня обробка материнських пагонів, макроелементи, концентрації гормонів, гелеутворювач та джерело вуглеводів. Найвища швидкість регенерації та найбільша кількість пагонів на експлантат листка була отримана з молодого листя на середовищі на основі макроелементів MS, доповненого 22 мкМ БАП та 0,1 мкМ НОК разом із сорбітолом, у концентраціях 165 мМ або 220 мМ. Сорбіт був ефективнішим, ніж сахароза, глюкоза, фруктоза або комбінація цих цукрів. Попередня обробка пагонів холодом і темрявою посилила формування додаткових пагонів.

Тидіазурон (TDZ) є ефективнішим, ніж  $N^6$ -бензиладенін (BA), для регенерації пагонів [25-27]. Оптимальна концентрація TDZ варіюється залежно від генотипу яблуні [28-29]. Н. Геймейдж, Т. Наканіші для розробки ефективної системи регенерації пагонів *in vitro* сорту яблуні «Оріне» (*Malus x domestica* Borkh.) провели кілька експериментів з використанням тканини листка як експлантату. «Оріне» є одним з провідних сортів яблуні в Японії. Сегменти листка були отримані з рослин яблуні, вирощених *in vitro*. Було досліджено вплив орієнтації та зрілості тканини на регенераційну здатність. Експлантати були протестовані на ініціацію пагонів на основному середовищі Мурасіге та Скуга (MS), доповненому різними комбінаціями та концентраціями регуляторів росту. На краях зрізів експлантату було видно утворення компактних ембріодоподібних структур, а також незначне утворення калюсу в присутності 20 мкМ ТДЗ (тидіазурону) та 0,1 мкМ НОК (нафталіноцтової кислоти) в темряві. Серед інших протестованих цитокінінів

ТДЗ знову довів свою високу цитокінінову активність для маніпуляцій *in vitro* з деревними видами рослин. Проліферація ембріодоподібних структур починалася, коли культури переносили на світло. Додавання 1,4 мкМ гіберелової кислоти до середовища сприяло видовженню пагонів. Проліферуючі маси пагонів субкультивували та підтримували на середовищі MS без регуляторів росту. Фактично, було цікаво спостерігати посилену проліферацію пагонів у цьому середовищі, ймовірно, через ефект «перенесення» ТДЗ.

Фасоло та ін. зазначили, що у трьох сортів ('McIntosh', 'Paladino Spur McIntosh' та 'Triple Red Delicious') 10 мкМ TDZ ефективно індукували пагони, але інші сорти ('M7', 'M9', 'M26', 'Orine', 'Golden Delicious', 'Melrose', 'Macspur', 'Strakrimson' та 'Fuji') індукували пагони, коли концентрація TDZ перевищувала 10,0 мкМ [30-32], хоча переважна більшість решти сортів найкраще реагували, коли TDZ застосовували в концентрації менше 5,0 мкМ [33]. Ряд сортів, таких як «Royal Gala» та «Dayton», подібно реагували на широкий діапазон концентрацій TDZ (5–20 мкМ) [34]. Нещодавно для кількох видів та генотипів яблуні були розроблені протоколи з використанням TDZ для індукції додаткових бруньок [35, 36]. Варто зазначити, що, як повідомлялося, TDZ індукує аномальні пагони у широкому спектрі рослин [37]. Враховуючи геномну нестабільність яблуні та очевидну легкість, з якою відбуваються епігенетичні зміни, використання TDZ є застережливим, оскільки існують деякі задокументовані випадки аномалій, викликаних TDZ, у культурі яблуні *in vitro*, такі як гіпергідричні пагони та карликовість, або фасціація пагонів [38], хоча розвиток цих явищ сильно залежить від рівня застосованого TDZ, а також від використаного генотипу [39]. Мерт та Сойлу [40] спостерігали гіпергідричні пагони у 38–45% кінчиків пазушних пагонів та у 31–38% кінчиків кінцевих пагонів для підщепи M9, але майже не спостерігали гіпергідричних пагонів у підщепях MM106 та MM111 на стадії формування пагона, але спостерігали 75–100%, 1–3% та 9–100% гіпергідричних пагонів для кінчиків пазушних пагонів M9,

ММ106 та ММ111 відповідно протягом трьох дат відбору проб (53–83%, 1–11% та 1–65% для кінцевих пагонів М9, ММ106 та ММ111 відповідно). Подовження пагона ефективно досягається шляхом додавання гіберелової кислоти ГК<sub>3</sub>, але тут також необхідна концентрація залежить від генотипу [13].

## **1.5. Вплив складових живильного середовища на мікроклональне розмноження яблуні**

### **1.5.1. Регулятори росту рослин**

Найважливішим фактором, який визначає розвиток та ріст пагонів яблуні *in vitro*, є вибір регуляторів росту, що застосовуються в середовищі [13]. Amiri та Elahinia [41] показали, як вибір регуляторів росту, зокрема використання TDZ та 6-бензиладеніну (БА), вплинув на результат індукції пагонів у трьох підщепах, тоді як ГК<sub>3</sub> був необхідним для видовження пагонів. Було досліджено вплив складу середовища на різні аспекти росту підщеп яблуні. Результати показали, що різні генотипи підщеп 'М9', 'М27' та 'ММ106' мали різний потенціал мікророзмноження. Швидкість розмноження головним чином залежала від виду регуляторів росту рослин (особливо 6-бензиламінопурину (БАП)) та генотипів). Найвищий коефіцієнт розмноження пагонів з точки зору кількості та якості пагонів була отримана при використанні 4,4 мкМ БАП під час фази розмноження пагонів, та 8,8 мкМ БАП та 2,8 мкМ ГК<sub>3</sub> під час фази подовження пагонів для всіх генотипів ('М9', 'М27', 'ММ106'). Застосування високої (2,8 мкМ) концентрації ГК<sub>3</sub> збільшило подовження додаткових пагонів порівняно з низькими концентраціями. Найвищий коефіцієнт розмноження (5,7 пагонів) та найбільша загальна свіжа маса (2,25 г/банку) як коефіцієнт росту були отримані шляхом застосування 4,4 мкМ БА для генотипу 'М27'. Потенціал мікророзмноження генотипу 'М27' був вищим, ніж у інших генотипів. Генотип 'ММ106' мав найнижчий коефіцієнт розмноження (0,7 пагона/місяць) без урахування БА. Розмноження експлантів з 1-ї

субкультури було чутливішим до БА, ніж з 3-ї або 4-ї субкультури. Укорінення експлантів значно сприяло ІМК, і найкращий результат укорінення був досягнутий у середовищі MS половинної концентрації, що містило 5,4 мкМ ІМК. Найвищий відсоток укорінення (40%) був отриманий для генотипу 'M27'. Коренеутворення збільшувалося зі зменшенням концентрації БА (під час розмноження пагонів), але збільшенням ауксинів (ІМК). Відсоток вкорінення культур пагонів у середовищі з низькою концентрацією мінералів (середовище 1/2 MS) був значно вищим, ніж у культур пагонів у середовищі з високою концентрацією 2×MS.

Фактично, переважна більшість досліджень розмноження пагонів яблуні використовувала або БА, або ТДЗ [42]. Дастьєрд З.Х. та ін. [43] зазначили, що ефективна індукція та видовження пагонів підщепи M26 були можливі лише тоді, коли середовище містило комбінацію БА, крабового хітозану та ГК<sub>3</sub>. Дане дослідження було проведено для оцінки здатності до проліферації підщепи яблуні M26 на середовищі MS, доповненому різними концентраціями хітозану з краба, гіберелової кислоти (ГК<sub>3</sub>) та N6-бензиладеніну (БА). Комбінація 120 мг·л<sup>-1</sup> хітозану та 0,5 мг·л<sup>-1</sup> БА за відсутності ГК<sub>3</sub> була найбільш придатною для проліферації через 12 тижнів. Без хітозану загальна кількість пагонів збільшувалася зі збільшенням концентрації БА, але пагони призводили до розеткового та густого росту, розвиваючи крихітні жовтуваті листки з м'якими та водянистими тканинами. Пагони висотою понад 3 см були отримані при застосуванні 0,1 або 0,3 мг·л<sup>-1</sup> ГК<sub>3</sub> у поєднанні зі 120 мг·л<sup>-1</sup> хітозану, але листки були дрібними з жовтувато-зеленим кольором. Ці результати свідчать про те, що хітозан може бути використаний як стимулятор росту в поєднанні з невеликою кількістю регуляторів росту рослин для покращення швидкості проліферації підщепи яблуні M26, культивованої *in vitro*.

Цікаво, що відносну концентрацію цих трьох сполук можна було використовувати для маніпулювання формою росту *in vitro*, наприклад, для збільшення куцистості в результаті утворення більшої чи меншої кількості

листя або більш чи менш видовжених пагонів, що має потенційне застосування в декоративних культурах *in vitro*. У цьому дослідженні вперше повідомлялося про використання хітозану в культурі тканин яблуні, що вказує на хітозан як перспективну добавку в культурі тканин деревних порід. Хітозан широко використовується в культурах тканин орхідей і має широкий спектр біологічних властивостей, включаючи антимікробні та стимулюючі ріст рослин [44]. ТДЗ розмножував пагони ефективніше, ніж БА у восьми традиційних галісійських сортах яблуні, але його оптимальна концентрація залежала від сорту [45]. Однак відсоток гіпергідричних пагонів був найвищим у п'яти з восьми сортів, тоді як у двох сортах ('Ollo Mouro', 'José Antonio') він перевищував 50%, коли ТДЗ було додано до середовища для розмноження пагонів [45].

Генг Ф. та ін. [46] відзначили важливість  $GA_3$  для розвитку пагонів у трьох підщепках, виведених із селекційної програми Cornell-Geneva (серія Geneva<sup>®</sup>), залежно від джерела світла, тоді як червоне світло індукувало значно більше пагонів і довші пагони, ніж при використанні білого або синього світла, але це залежало від сорту. Вплив довжин хвиль червоного та синього світла було протестовано для покращення початкового розмноження *in vitro* підщеп яблуні (*Malus × domestica*) сортів Будаговський 9 (В.9), Женева 30 (G.30) та Женева 41 (G.41). Одновузлові сегменти були створені в напівтвердому середовищі Мурасіге та Скуга, а потім перенесені в середовище для проліферації та культивовані протягом 40 днів під білим, червоним або синім світлом. У другому експерименті G.30 культивували під червоним, синім або білим світлом з гібереловою кислотою ( $GA_3$ ) та без неї. Три підщепи реагували подібно на біле світло з точки зору кількості пагонів, довжини найдовшого пагона та кількості видовжених пагонів. Червоне світло збільшило кількість пагонів, довжину найдовшого пагона та кількість видовжених пагонів В.9 та G.30 порівняно з білим або синім світлом. Червоне світло збільшило кількість видовжених пагонів В.9 та G.30 до п'яти на експлант порівняно з одним на експлант під білим світлом. Натомість, ріст

пагонів G.41 не показав жодної різниці за трьох варіантів обробки освітлення, а кількість видовжених пагонів на експлант була меншою за один. Порівняно з відсутністю GA3, концентрація GA3 0,5 мг·л<sup>-1</sup> сприяла росту пагонів G.30 *in vitro* під червоним та синім світлом

Вивчаючи вплив постачання цитокінінів (BA, BAR, mT та подвійне застосування BA + mT) на якість пазушних пагонів яблуні сортів 'Royal Gala' та 'Freedom', Добранські та Мендлер-Дренсьовські (2014, 2015) зазначили, що вибір цитокініну впливав на вміст хлорофілу (хл), а також на функціональність фотосинтетичного апарату (максимальний квантовий вихід  $F_v/F_m$  та максимальна ефективність фотохімічного процесу,  $F_v/F_0$ , світлова флуоресценція хл,  $Y(II)$ ) у листках пазушних пагонів після трьох тижнів культивування. Значення  $F_v/F_m$  варіювалися від 0,683 до 0,861 у 'Royal Gala' та від 0,709 до 0,790 у 'Freedom', що відповідали значенням флуоресценції хл, вимірним у рослин, вирощених у польових умовах. Вплив цитокінінів залежав від генотипу. Загальний вміст хлору в листі був найвищим, коли сорту «Royal Gala» вводили BA, а сорту «Freedom» — mT. У сорту «Royal Gala» використовували 0,5 мкМ BA або 2,0–25,0 мкМ BAR [47], тоді як у сорту «Freedom» введення двох цитокінінів (2,2 мкМ BA + 2,0 мкМ mT) сприяло темній та світлій флуоресценції хлору, вимірній у третьому, розвиненому верхівковому листку [47].

### **1.5.2. Джерело вуглеводів**

Патхак Х. та Дхаван В. [48] виявили, що ріст пагонів підщеп M7 та MM111 може підтримуватися на середовищі, що містить від 1 до 5% фруктози, глюкози, манітолу, сорбітолу та сахарози, причому найефективніша концентрація призводить до найдовших пагонів та найбільшої продуктивності при 4% сахарози та сорбітолу для M7 та MM111 відповідно. Порівнювали вплив п'яти різних джерел вуглеводів: фруктози, глюкози, манітолу, сорбітолу та сахарози на проліферацію пагонів *in vitro* підщеп яблуні (*Malus × domestica* Borkh.), M 7 та MM 111. Тип та

концентрація вуглеводів мали значний вплив на швидкість розмноження та довжину пагонів і, як було виявлено, змінювалися залежно від підщепи. У М 7 максимальне розмноження 4,57 та довжина пагона 2,54 см було отримано при 4% сахарозі. Друга найкраща реакція спостерігалася при 5% глюкозі. Хоча вплив глюкози суттєво не відрізнявся від сорбітолу, видовження пагонів було більш посиленим на середовищі з глюкозою. Навпаки, у ММ 111 4% сорбітолу призвів до найкращої швидкості розмноження (3,31) та довжини пагона (2,30 см), за ним ішла 4% сахароза. Манітол та фруктоза призводять до недостатньої якості та росту пагонів обох підщеп. Вуглеводи, крім того, що впливають на швидкість проліферації, також корелювали з виникненням гіпергідратації. За нижчих концентрацій усіх протестованих вуглеводів спостерігалася сильна гіпергідратація та затримка росту пагонів у М 7, а також ММ 111. Гіпергідратація була найвищою при застосуванні манітолу та фруктози. Результати вказують на генотип-залежну реакцію культур пагонів яблуневих підщеп на різні вуглеводи. Таким чином, це дослідження пропонує ідентифікацію та оптимізацію найефективнішого вуглеводу для розмноження кожного сорту як необхідний крок для розробки ефективного протоколу мікророзмноження.

### **1.5.3. Гелеутворювачі**

Перейра-Нетто та ін. [49] частково замінили агар галактомананом і змогли збільшити продуктивність пагонів у кілька разів. Агар-агар – це складна суміш гелеутворюючих полісахаридів. Гелеутворюючі агенти дуже часто використовуються для забезпечення належної підтримки рослин, вирощених у напівтвердих середовищах для культивування. Агар є найчастіше використовуваним гелеутворюючим агентом у середовищах для культивування тканин рослин. Галактоманани, інша група гелеутворюючих полісахаридів, складаються з (1 → 4)-зв'язаного  $\beta$ -D-маннопіранозильного остова, частково заміщеного в положенні О-6 D-галактопіранозильними бічними групами. У цій роботі ми демонструємо, що статистично значуще

2,7-кратне збільшення коефіцієнта розмноження (MR) для пагонів Marubakaido (*Malus prunifolia*), вирощених *in vitro*, було пов'язане з 12,5% заміною агару в напівтвердому середовищі для культивування на галактоманнан, отриманий з насіння *Schizolobium paraybae*. Це збільшення MR було зумовлене головним чином 1,9-кратним збільшенням кількості основних гілок та 8,6-кратним збільшенням кількості первинних бічних гілок. Аналізи за допомогою газо-рідинної хроматографії та тонкошарової хроматографії показали, що підвищення швидкості розмноження *in vitro* підщепи яблуні Марубакайдо, зумовлене галактомананом, не було пов'язане з деградацією галактоманану.

Використання альтернативних гелеутворюючих агентів може бути способом зниження вартості мікророзмноження [50]. Культура тканин рослин широко використовується для мікророзмноження рослин, що мають лісове, садівниче та медичне значення. Однак успіх масового розмноження та його економічна доцільність залежать від кількох факторів, які впливають на масштабування виробництва. Низькі темпи розмноження пагонів, зростання вартості інгредієнтів середовища, втрата культур через забруднення та труднощі, що виникають під час загартування та акліматизації, є основними перешкодами, що негативно впливають на масштабування технологій мікророзмноження. Велика кількість технологій *in vitro*, розроблених для ряду видів рослин, залишалася обмеженою лабораторіями через такі обмеження. Для того, щоб поширити технологію культур тканин на масштабне розмноження, необхідно розробити методи, які є відносно простими, мають високий коефіцієнт розмноження з високим ступенем відтворюваності та забезпечують високий рівень виживання мікропагонів або рослин після перенесення в умови *ex vitro*. Інноваційні підходи, такі як використання рідких систем культивування, заміна агару іншими гелеутворюючими агентами, зокрема гуарова камедь, вирощування культур у середовищі, збагаченому CO<sub>2</sub>, загартування *in vitro*, праймування рослин, вирощених у тканинних культурах, за допомогою антитранспірантів або

біопраймерів протягом періоду відлучення та покращення середовища в посудинах для культури за допомогою вентиляції та інших засобів виявилися дуже корисними. Такі підходи не тільки дозволять виробляти мікроклони, які є порівняно дешевшими та кращими за своєю пост-вітро продуктивністю в ґрунтовому середовищі, але й допоможуть створити життєздатну технологію мікророзмноження, придатну для масового виробництва бажаних видів рослин. Коли 50% агару-агару було замінено гуаровою каміддю в середовищі, швидкість дифузії суміші покращилася, міцність та еластичні властивості суміші агару та гуарової каміді зменшилися, її динамічна еластичність зменшилася до однієї третини агарового гелю, а швидкість розмноження пагонів збільшилася до 8,9, тоді як швидкість гіпергідричних пагонів знизилася до 12% з 59% на агаровому гелі.

#### **1.6. Укорінення та акліматизація**

Укорінення мікропагонів яблуні *in vitro* можна індукувати за допомогою різних ауксинів, таких як індол-3-масляна кислота (ІВА, 0,3-3,0 мг/л),  $\alpha$ -нафталіноцтова кислота (НОК; 0,1–1,0 мг/л) або індол-3-оцтова кислота (ІОК; 1 мг/л). Було розроблено серію методів, і більшість з них використовували двофазний протокол для укорінення *in vitro* [13].

Загальноновизнано, що ауксин необхідний для індукції коренів, але його постійна присутність у середовищі пригнічує розвиток додаткових коренів [13].

Укорінення мікропагонів включає коротку фазу індукції коренів (тривалістю до одного тижня), за якою йде довша фаза видовження коренів (кілька тижнів). ІМК часто застосовували у фазі індукції кореневої системи, тоді як НОК переважно застосовували або використовували середовище без ауксину у фазі видовження кореня [13].

ІМК був найчастіше застосовуваним ауксином для вкорінення різних генотипів яблуні, причому відсоток вкорінення коливався від 18 до 100%, залежно від застосованої концентрації та генотипу. Успіх вкорінення також

залежить від типу експлантату, який використовувався для вкорінення: 63–90% кінцевих кінчиків пагонів MM106 вкорінювалися порівняно з 69–74% з пазушних кінчиків пагонів [14].

Амірі та Елахінія [17] зазначили, що присутність ІВА була необхідною для вкорінення трьох підщеп (M9, M27, MM106), але лише за умови зниження концентрації цитокінінів, тобто ефективність вкорінення зростала при зниженні рівня цитокінінів або підвищенні рівня ауксину.

Укорінення експлантів значно сприяло індол-3-масляній кислоті (ІМК), і найкращий результат для вкорінення був досягнутий у середовищі MS половинної концентрації, що містило 5,4 мкМ ІМК та 1,2 мкМ 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д).

Найвищий відсоток укорінення (64%) спостерігався для генотипу 'MM106', а найнижчий (11%) – для 'M9' через 3 місяці. Утворення коренів збільшувалося зі зниженням концентрації цитокінінів, але зі зростанням ауксинів (ІМК). Відсоток укорінення культур пагонів у середовищі з низькою концентрацією 1/2X-MS був значно вищим, ніж у культур пагонів у середовищі з високою концентрацією 2X-MS.

Флороглюцинол (ФГ), похідне фенолу, успішно застосовується для вкорінення *in vitro* багатьох рослин, включаючи яблуню, вид, який зазвичай вважається важко вкорінюваним [20], і є таким же або навіть ефективнішим, ніж зазвичай використовувані ауксини [13].

Однак ефект ФГ залежить від генотипу, як описано в попередніх дослідженнях [13]. Поєднання ФГ (162 мг/л) з ІМК (2 мг/л) призвело до значного збільшення вкорінення (від 5,5% до 69%) підщепи яблуні M.9 [27].

Вебстер та Джонс [25] досягли 93% вкорінення *in vitro* на пагонах підщепи M.9, коли до середовища для вкорінення було додано лише 162 мг/л ФГ після 21 субкультурування. Відсоток вкорінення становив 77% на середовищі без ФГ, але лише 69%, коли ФГ додавали лише до середовища для індукції пагонів. Аналогічно, якщо ФГ застосовували до середовища для

вкорінення у випадку підщепи Tydeman Early Worcester, відсоток вкорінення збільшувався з 50% у середовищі без ФГ до 68% [33].

Протилежний ефект був виявлений у підщепи ММ.106, коли ФГ застосовували до середовища для вкорінення, оскільки відсоток вкорінення знизився з 66% до 53% на середовищі без ФГ. Однак, ФГ, внесений до середовища для проліферації пагонів, мав сприятливий подальший ефект на вкорінення, збільшуючи його до 81% [35].

Акліматизація мікропагонів, вкорінених *in vitro*, може бути досягнута в широкому діапазоні субстратів, таких як вермикомпост, кокосовий торф, пісок та перліт, зазвичай у змішаному співвідношенні, тоді як використання арбускулярних мікоризних грибів (АМГ), як було показано, покращує акліматизацію яблуні, отриманої *in vitro*, головним чином з ендомікоризою з роду *Glomus*, хоча до 2010 року було опубліковано лише близько півдюжини досліджень яблуні з використанням АМГ [13].

Пагони, вкорінені *in vitro*, були успішно (80–100%) загартовані в різних субстратах, таких як кокосовий торф, торф, ґрунт: пісок (3:1 об./об.), суміш вермикуліту та кокоторфу, або в ґрунті: вермикуліт: перліт (1:1:1 об./об./об.).

Ветторі та ін. [51] виявили, що при застосуванні ризобактерій (*Azospirillum brasilense* Sp245) під час фази акліматизації біомаса та маса стебла підщепи ММ106 покращилися.

Було оцінено вплив *Azospirillum brasilense* Sp245 на мікророзмноження трьох плодкових підщеп: сливи Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* × *P. spinosa*), гібрида GF 677 (*Prunus persica* × *P. amigdalus*) та яблуні ММ 106 (Northen Sprу×М1). Вкорінені пагони обробляли  $3 \times 10^7$  клітин Sp245 під час пересадки з культур *in vitro* до фази акліматизації. Через 60 днів інокулят Sp245 позитивно вплинув на параметри росту.

У випадку Mr.S 2/5 відзначено збільшення довжини стебла підщепи та кількості вузлів на 37% та 42% відповідно порівняно з контролем. У випадку GF 677 бактеріальний інокулят збільшив довжину стебла та кількість вузлів на 75% та 65% відповідно порівняно з контролем. Інокулят не впливав на

ММ 106 за обома параметрами, що свідчить про те, що вплив Sp245 може залежати від специфічної асоціації клон-мікроб. Однак у всіх випадках у інокульованих рослин спостерігалася вища енергія, що узгоджується з ширшою площею листя, що демонструє, що використання *Azospirillum* може суттєво сприяти оптимізації продуктивності рослин протягом фази адаптації рослин до поствітрумних умов.

## РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкт дослідження

Для здійснення процесу розмноження у рамках дослідження було використано насіння та рослини яблуні декоративної сорту Ред Сентинел (*Malus Red Sentinel*). Це невелике, але надзвичайно декоративне дерево, яке вражає яскравими темно-червоними плодами, що за розміром нагадують вишню. Навесні з блідо-рожевих бутонів розквітають білі квіти з рум'яними відтінками, які мають приємний і виразний аромат. Зелене листя упродовж осені набуває бронзово-жовтого відтінку, а після його опадання на гілках залишаються блискучі червоні плоди, що можуть зберігатися протягом усієї зими.

За формою рослина може набувати вигляду великого куща або невеликого дерева зі стрункою кроною та характерними глибоко звисаючими бічними гілками. Її розміри становлять від 4 до 5 метрів у висоту та від 2,5 до 3,5 метрів у ширину. Листя розташоване почергово, овальної форми, досягає довжини до 7,5 см і ширини до 3,5 см, має середньо-зелений колір з червонуватими черешками.

Цвітіння розпочинається з травня та триває до червня – бруньки білі або світло-рожеві, квіти поодинокі, діаметром до 3 см. Плоди – кулястої, дещо неправильної форми, з чіткими ребрами, здебільшого без чашечки або з заглибленою чашечкою. Їх довжина становить від 1,8 до 2,2 см, ширина – від 2 до 2,5 см. На сонячній стороні вони вишнево-червоні, у затінку набувають жовто-оранжевого відтінку. Стебла завдовжки близько 2,5 см, вкриті червонуватою оболонкою. Плоди здатні довго залишатися на гілках, зберігаючи декоративність дерева.

Коренева система рослини – серцевидна, добре розгалужена. Яблуня найкраще росте на добре зволжених, пухких садових ґрунтах, хоча загалом не є вибагливою. Погано переносить засоленість і застій вологи, хоча може

витримувати короткочасну посуху, особливо за умов помірного і регулярного поливу. Потребує повного освітлення або легкого затінення.

Застосовується в оформленні квіткових бордюрів, клумб, як координаційний акцент у ландшафтному дизайні міських і присадибних садів. Ці крабові яблука придатні для кулінарного використання, зокрема для приготування желе, і часто використовуються у різдвяних декораціях. При спалюванні деревина яблуні видає приємний аромат, а дим додає особливого смаку копченим продуктам.

Сорт відноситься до кліматичної зони морозостійкості 5, що охоплює всю територію України – від Закарпаття (зони 5b – 6b) до Луганської області (5a – 5b) та Криму (6a – 7b).



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд.

## **2.2. Одержання молодих проростків яблуні райської Ред Сентинел**

У якості посадкового матеріалу використовували насіння яблук, в першу чергу слід визначились з вибором самих плодів. Враховуючи низьку самостійну схожість насіння його необхідно стратифікувати. Для цього насіння на кілька тижнів поміщали на нижню полицю холодильника. Таким чином закаляли насіння і імітували зимовий період, провокуючи і прискорюючи подальше проростання. Після чого можна переходити до замочування насіння у вологій серветці або посадці в торф'яний ґрунт. На цьому етапі необхідно дотримувати температурний режим, а саме  $+4...+10\text{ C}$  і стежити, щоб насіння було постійно зволожено.

Для пророщування насіння яблуні райської Ред Сентинел стерилізували розчином Білизни в концентрації 1:2 протягом 15 хвилин і переносили у стакан із зволеним перлітом і витримували при температурі  $+4\text{ C}$  протягом 4 тижнів. Після цього насіння переносили у світлову культуральну кімнату з освітленням 400 лк і температурою  $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  і 14 годинному фотоперіоді.

## **2.3. Введення в культуру яблуні райської Ред Сентинел**

Одержані проростки яблуні райської Ред Сентинел використовували для введення в культуру, для цього проростки зрізали і стерилізували розчином Білизна і концентрації 1:3 протягом 10-15 хвилини. Роботу проводили в підготовленому ламінарному боксі. Простерилізовані експлантати відмивали від розчину Білизна в трьох порціях стерильної дистильованої води. Відмиті експлантати переносили в стерильну чашку Петрі із стерильним фільтрувальним папером. Надалі експлантати стерильним пінцетом переносили на живильне середовище у пробірки (таблиця 2.1). Всі роботи зі стерилізації насіння проводили в ламінарному боксі.

Таблиця 2.1.

## Склад живильного середовища

Компоненти	Вміст, на 1 л
Макроелементи МС	100,0 мл
Мікроелементи МС	1,0 мл
Вітаміни МС	1,0 мл
Fe-хелат	5,0 мл
БАП	0,5 мл
ІОК	0,1 мл
ГК	1,0 мл
Аскорбінова кислота	2,0 мл
Сахароза	30,0 г

**2.4. Тест на ендофітну інфекцію**

Одержані проростки перевіряли на наявність ендофітної мікрофлори. Для цього експлантати розкладали на живильне середовище (таблиця 2.2)

Таблиця 2.2

## Склад живильного середовища

Компоненти	Вміст
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 г/л
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,15 г/л
джелрайт	6 г/л
сахароза	10 г/л
гідролізат казеїну	8 г/л
дріжджовий екстракт	4 г/л

**2.5. Мікроклональне розмноження яблуні райської Ред Сентинел**

Для розмноження рослин *in vitro* потрібно ввести в культуру будь-який первинний експлант. Фактично будь-який орган або тканина можуть бути

джерелом експлантів, однак успіх при цьому буде різним. Так, при використанні як експланта стебла або листка важливо враховувати, з яких частин рослини (верхніх чи нижніх) береться тканина, її вік і фізіологічний стан. Часто на морфогенез експланта впливає сезонність.

#### Умови культивування рослин *in vitro*

1. Живильне середовище. Склад живильного середовища для вирощування рослин повинен забезпечувати усі їхні потреби для нормального росту і розмноження, і може змінюватися залежно від генотипу рослини, стадії культивування, тощо. Типове живильне середовище містить неорганічні солі (з мікро- і макроелементами), цукри як джерело енергії, вітаміни (нікотинова кислота, тіамін та ін.), амінокислоти і рослинні гормони (ауксини, цитокиніни, гібереліни). Важливим є дотримання оптимального рН поживного середовища.

2. Асептичні умови. Вкрай важливим є підтримання асептичних (стерильних) умов при вирощуванні рослин в культурі *in vitro*. Поживне середовище містить цукри, які створюють сприятливі умови для росту мікроорганізмів – бактерій та грибів, що призводить до загибелі висаджених рослинних експлантів. Стерилент і умови стерилізації підбираються такі, щоб знищити мікроорганізми (бактерії або спори грибів), але в той же час не заподіяти шкоди рослинному матеріалу. При подальшому вирощуванні, отримані після введення *in vitro* стерильні рослини, пересаджуються також в асептичних умовах.

3. Умови вирощування. Культуральні посудини із рослинами розташовують у спеціально облаштованих кліматичних кімнатах із чітко регульованими світловим і температурним режимами.

Для мікроклонального розмноження яблуні райської Ред Сентинел використовували модифіковане живильне середовище МС наступного складу (таблиця 2.3)

Склад регенераційного живильного середовища

Компоненти	Вміст, на 1 л
Макроелементи МС	100,0 мл
Мікроелементи МС	1,0 мл
Вітаміни МС	1,0 мл
Fe-хелат	5,0 мл
БАП	0,5 мл
ІМК	0,1 мл
Джелрайт	1,5 мл
Сахароза	30,0 г
Агар	6,0 г

Пробірки з рослинами-регенерантами культивували в світловій культуральній кімнаті за температури  $24 \pm 1$  С, 14 годинному фотоперіоду, 80% вологості.

Коефіцієнт мікроклонального розмноження розраховували за формулою:

$$K_p = x/yc$$

x – кількість утворених пагонів

y – кількість висаджених пагонів

c – кількість пасажей.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Excel 2016.

## **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **3.1. Пророщування насіння яблуні райської Ред Сентинел для введення в культуру *in vitro***

Під схожістю розуміють кількість нормально пророслого насіння в пробі, взятої для аналізу, виражене у відсотках. Лабораторну схожість насіння визначають при оптимальних умовах пророщування протягом 7-10 днів в залежності від культури.

Визначення схожості - один з найважливіших видів оцінки посівних якостей насіння, оскільки при незадовільній схожості посіви будуть зріджені, що значною мірою впливає на урожай сільськогосподарських культур. Схожість насіння повинна наближатися до 100%.

Лабораторна схожість насіння – вміст схожих насінин, визначений в лабораторних умовах відповідно до вимог стандарту, виражений у відсотках. Отримані результати по схожості насіння порівнюють з даними ДСТУ і встановлюють, до якого класу по схожості насіння можна віднести аналізований зразок. Якщо насіння по схожості не відповідають вимогам стандарту, їх відносять до некондиційного. Насіння з низькою схожістю, яке зберегло життєздатність, піддають повітряно-тепловій обробці, і, якщо після цього схожість підвищується незначно і не досягає норм стандарту, їх бракують і переводять в продовольчий або фуражний фонд, а на насінневі цілі виділяють нову партію.

Схожість насіння яблуні перевіряли після стратифікації і без проведення стратифікації. Нами було встановлено, що в результаті стратифікації лабораторна схожість насіння була високою у всіх стратифікованих зразках. В середньому лабораторна схожість становила 90%

Відсоток лабораторної схожості насіння без стратифікації була нижчою і становила не більше 48%.



Рис. 3.1. Насіння яблуні райської Ред Сентинел



Рис. 3.2. Пророщування насіння яблуні райської Ред Сентинел в перліті під час стратифікації



Рис. 3.3. Проростки яблуні райської Ред Сентинел.

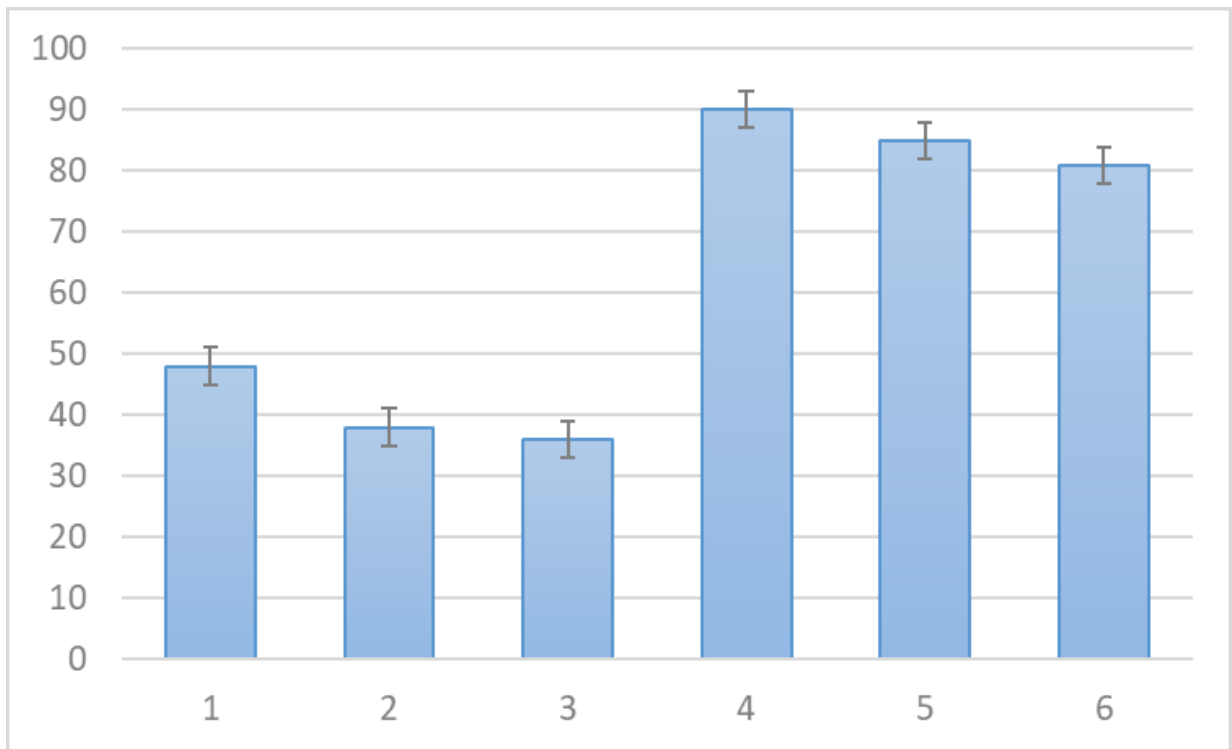


Рис. 3.4. Лабораторна схожість насіння яблуні райської Ред Сентинел після стратифікації протягом 6 тижнів (1, 2, 3 – без стратифікації, 4, 5, 6 – після стратифікації).

### 3.2. Одержання стерильних проростків яблуні райської Ред Сентинел

Стерилізація – це процес знищення всіх видів мікробної флори, в тому числі їх спорових форм, і вірусів за допомогою фізичних або хімічних впливів. Стерилізуючі агенти, що використовуються для оптимізації протоколу стерилізації *in vitro*, – це етанол, гіпохлорит натрію (NaOCl), гіпохлорит кальцію, хлорид ртуті (HgCl<sub>2</sub>) та перекис водню. Через фітотоксичність цих стерилізуючих агентів, концентрацію та тривалість впливу необхідно визначати для різних експлантів.

Для одержання стерильних проростків яблуні ми використовували стерилізуючий розчин Білизни (NaOCl) в концентрації 1:3. Нами було встановлено, що стерилізація проростків яблуні, протягом 10 хв була більш оптимальною. Життєздатність проростків при даній тривалості стерилізації була вища порівняно із стерилізацією протягом 15 хвилин. За даного варіанту

стерилізації було відмічено високий відсоток некрозу. Кількість інфікованих проростків за двох варіантів стерилізації було практично на одному рівні (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Введення в культуру *in vitro* яблуни райської Ред Сентинел

Зразок	Кількість експлантатів	Некроз пагонів		Інфіковані пагони	
		шт	%	шт	%
Стерилізація пагонів 10 хв NaOCl					
Зразок 1	20	1	5	2	10
Зразок 2	20	1	5	1	5
Зразок 3	20	2	10	3	15
Середнє відхилення			6,6±0,7		10,0±0,8
Стерилізація пагонів 15 хв NaOCl					
Зразок 1	20	3	15	3	15
Зразок 2	20	4	20	5	25
Зразок 3	20	3	15	4	20
Середнє відхилення			16,6±0,6		20,0±1,0

У культурі рослинних тканин побуріння – це процес, під час якого експлантати вивільняють коричневі екsudати або фенольні сполуки в середовище зі своїх зрізаних поверхонь у процесі дедиференціації та/або повторної диференціації. Беруто та ін. [39] повідомили про утворення фенолів шляхом підвищеної активності поліфенолоксидази (ПФО). Крім того, фермент фенілаланін-аміакліаза (ФАЛ) перетворює фенілаланін на вільні фенольні речовини для ПФО [40]. Різні автори повідомляли про участь ПАЛ та ПФО у побурінні тканин різних видів рослин, таких як солодка картопля, капуста, яблуна, груша, ананас та трав'янистий півонія [41].

Різні фактори, що впливають на потемніння, це попередня обробка, середовище, частота субкультур та температура [48]. Деревне вугілля адсорбує феноли, тим самим позбавляючи ферменти субстратів, необхідних для утворення полімерів, які надають середовищу потемніння [49, 50]. Крім того, Фан та ін. [51] повідомили про пригнічення активності PPO NaCl, а також лимонною та аскорбіною кислотами.

Для зменшення інтенсивності виділення фенолів ми використовували декілька способів, це постійне перенесення експлантів на нове живильне середовище і додавання в живильне середовище аскорбінової кислоти (рис. 3.5-3.6).



Рис. 3.5. Культивування рослин-регенерантів 2 тижні на рідкому живильному середовищі



Рис. 3.6. Культивування рослин-регенерантів 3 тижні на твердому живильному середовищі

### **3.3. Перевірка рослин-регенерантів яблуні райської Ред Сентинел на присутність ендоефітної мікрофлори**

Ендоефітні забруднювачі були поширеною проблемою для розмноження деревних рослин *in vitro* та мають значні економічні наслідки для збереження генетичних ресурсів рослин та комерційного мікророзмноження [14].

Протокол мікророзмноження проходить через низку етапів, починаючи зі створення асептичних культур [3].

Уникнення мікробного забруднення культур рослинних тканин має вирішальне значення для успішного мікророзмноження [11].

Незважаючи на значну поверхневу стерилізацію та використання найкращих практик підтримки культури, забруднення рослинної тканини може бути постійною проблемою під час мікророзмноження [12].

Це джерело забруднення відоме як ендоефіти, які викликають особливе занепокоєння, оскільки вони можуть вижити після поверхневої стерилізації [14].

Забруднення ендоефітами спричиняє втрати культури та безпосередньо впливає на ефективність протоколів мікророзмноження [13].

Ці мікроорганізми живуть у тканинах рослин і можуть не бути видимими до кількох раундів субкультивування та/або після того, як культури зазнали певного стресу [15].

Після трьох тижнів культивування рослин-регенерантів на модифікованому живильному середовищі МС, проводили перевірку рослинного матеріалу на наявність ендоефітної інфекції на селективному середовищі 523.

Було встановлено, що кількість інфікованих рослин-регенерантів яблуні райської Ред Сентинел не перевищувала 10,2%, асептичними були 96,8% рослин-регенерантів (табл. 3.2).

Введення в культуру *in vitro* яблуні райської Ред Сентинел

Зразок	Кількість експлантатів	Кількість життєздатних пагонів		Кількість асептичних Пагонів після тесту на середовищі 523	
		шт	%	шт	%
Стерилізація пагонів 10 хв NaOCl					
Зразок 1	30	28	96,1±0,2	29	96,8±0,4
Зразок 2	30	26	97,8±0,4	25	95,7±0,4
Зразок 3	30	28	98,2±0,4	27	96,2±0,2
Стерилізація пагонів 15 хв N0,2aOCl					
Зразок 1	30	22	99,1±0,2	21	94,7±0,2
Зразок 2	30	19	98,4±0,2	20	95,3±0,4
Зразок 3	30	20	97,5±0,2	23	96,7±0,2



Рис. 3.7. Мікроклонально розмножені рослини-регенеранти яблуні.

Таким чином, нами показано що одержання рослин-регенерантів через використання проростків стерильного насіння для введення в культуру і дозволяє отримувати високий відсоток асептичних рослин без наявності ендofітної мікрофлори.

Надалі рослини-регенеранти були розмножені в культурі і коефіцієнт розмноження в середньому становив 3,2.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що для мікророзмноження в культурі *in vitro* яблуні райської Ред Сентинел ефективний метод стратифікації насіння в перліті протягом 6 тижнів. В середньому лабораторна схожість насіння яблуні райської Ред Сентинел становила 90%.

2. Для отримання стерильних рослин-регенерантів в культуру *in vitro* яблуні райської Ред Сентинел ефективною була стерилізація проростків розчином Білизни в концентрації 1:3 протягом 10 хвилини. Відмічено високий відсоток одержання асептичних рослин без ендofітної інфекції.

3. Коефіцієнт мікроклонального розмноження яблуні райської Ред Сентинел на модифікованому середовищі МС, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ІМК, становив 3,2.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Delgado-Paredes, G.E.; Vásquez-Díaz, C.; Esquerre-Ibañez, B.; Bazán-Sernaqué, P.; Rojas-Idrogo, C. In vitro tissue culture in plants propagation and germplasm conservation of economically important species in Peru. *Sci. Agropecu.* 2021, *12*, 337–349.
2. Dobránski, J.; da Silva, J.A.T. Micropropagation of Apple—A review. *Biotechnol. Adv.* 2010, *28*, 462–488.
3. 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. *Int. J. Agric. Biol.* 2015, *17*, 1066–1070.
4. 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 Lett.* 2016, *37*, e386–e395.
5. Romadanova, N.V.; Nurmanov, M.M.; Makhmutova, I.A.; Kushnarenko, S.V. Production of super-elite planting stocks of apple varieties and clonal rootstocks. Science Bulletin of the Kazakh Agrotechnical University named after S. Seifullin 2018, *3*, 4–13.
6. Romadanova, N.V.; Tolegen, A.B.; Koken, T.E.; Nurmanov, M.M.; Kushnarenko, S.V. Chemotherapy of in vitro apple shoots as a method of viruses eradication. *Intern. J. Biol. Chem. Sci.* 2021, *14*, 48–55.
7. Bettoni, J.C.; Mathew, L.; Pathirana, R.; Wiedow, C.; Hunter, D.A.; McLachlan, A.; Khan, S.; Tang, J.; Nadarajan, J. Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M from infected in vitro-grown potato shoots using in vitro therapies. *Front. Plant Sci.* 2022, *13*, 878733.
8. Bettoni, J.C.; Bonnart, R.; Volk, G.M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2021, *144*, 21–34.

9. Wang, M.R.; Chen, L.; Teixeira da Silva, J.; Volk, G.M.; Wang, Q.C. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): Development, progress and future prospects. *Plant Cell Rep.* 2018, *37*, 689–709.
10. Arab, M.A.; Yadollahi, A.; Hosseini-Mazinani, M.; Bagheri, S. Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2014, *12*, 103–110.
11. El-Banna, A.N.; El-Mahrouk, M.E.; Dewir, Y.H.; Farid, M.A.; Elyazid, D.M.A.; Schumacher, H.M. Endophytic Bacteria in Banana In Vitro Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival. *Horticulturae* 2021, *7*, 526.
12. Orlikowska, T.; Nowak, K.; Reed, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2016, *128*, 487–508.
13. Teixeira da Silva, J.A., Gulyás, A., Magyar-Tábori, K. et al. In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta*. 2019, *249*, 975–1006.
14. Thomas, P. Plant tissue cultures ubiquitously harbor endophytic microorganisms. *Acta Hort.* 2010, *865*, 231–239.
15. Izarra, M.L.; Panta, A.L.; Maza, C.R.; Zea, B.C.; Cruzado, J.; Gutarra, L.R.; Riveira, C.R.; Ellis, D.; Kreuze, J.F. Identification and control of latent bacteria in in vitro cultures of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Front. Plant Sci.* 2020, *11*, 903.
16. Patle, P.N.; Navnage, N.P.; Ramteke, P.R. Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. *Int. J. Chem. Stud.* 2018, *6*, 270–274.
17. Dobránszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of apple—a review. *Biotechnol Adv* 28:462–488.
18. Kaushal N, Modgil M, Thakur M, Sharma DR (2005) In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. *Indian J Exp Biol* 43:561–565

19. Mert C, Soylu A (2010) Shoot location and collection time effects on meristem tip culture of some apple rootstocks. *Pak J Bot* 42:549–555
20. Bhatti S, Jha G (2010) Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Rep* 29:1215–1225.
21. Teixeira da Silva JA, Winarto B, Dobránszki J, Zeng SJ (2015) Disinfection procedures for in vitro propagation of *Anthurium*. *Folia Horti* 27:3–14.
22. Teixeira da Silva JA, Kulus D, Zhang X, Zeng SJ, Ma GH, Piqueras A (2016a) Disinfection of explants for saffron (*Crocus sativus* L.) tissue culture. *Env Exp Biol* 14:183–198.
23. Teixeira da Silva JA, Winarto B, Dobránszki J, Cardoso JC, Zeng SJ (2016b) Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium* in vitro culture. *Folia Horti* 28:57–75.
24. Paprštejn F, Sedlák J (2015) Micropropagation of Czech apple cultivars. *Acta Horti* 1083:267–271.
25. Sedlák J, Paprštejn F (2016) In vitro establishment and proliferation of apple cultivars. *Acta Horti* 1113:107–111.
26. Romadanova NV, Mishustina SA, Matakova GN, Kushnarenko SV, Rakhimbaev IR, Reed BM (2016b) In vitro collection methods for *Malus* shoot cultures used for developing a cryogenic bank in Kazakhstan. *Acta Horti* 1113:271–277.
27. Volz RK, McGhie T (2011) Genetic variability in apple fruit polyphenol composition in *Malus × domestica* and *Malus sieversii* germplasm grown in New Zealand. *J Agric Food Chem* 59:11509–11521.
28. Modgil M, Thakur M (2017) In vitro culture of clonal rootstocks of apple for their commercial exploitation. *Acta Horti* 1155:331–335.
29. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J (2011) The plant Growth Correction Factor. I. The hypothetical and philosophical basis. *Intl J Plant Dev Biol* 5:73–74

30. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J (2013) How timing of sampling can affect the outcome of the quantitative assessment of plant organogenesis. *Sci Hort* 159:59–66.
31. Mitić N, Stanišić M, Milojević J, Tubić L, Ćosić T, Nikolić R, Ninković S, Miletić R (2012) Optimization of in vitro regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. *HortScience* 47:1117–1122.
32. Li BQ, Feng CH, Hu LY, Wang MR, Chen L, Wang QC (2014) Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation–dehydration. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50:357–368.
33. Gamage N, Nakanishi T (2000) In vitro shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar “Orine”): high shoot proliferation using carry over effect of TDZ. *Acta Hort* 520:291–300.
34. Podwyszyńska M, Sowik I, Machlańska A, Kruczyńska D, Dyki B (2017) In vitro tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. *Sci Hort* 226:379–388.
35. Dewir YH, Nurman S, Naidoo Y, Teixeira da Silva JA (2018) Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. *Plant Cell Rep* 37:1451–1470.
36. Kereša S, Mihovilović Bošnjak A, Barić M, Habuš Jerčić I, Šarčević H, Biško A (2012) Efficient axillary shoot proliferation and in vitro rooting of apple cv. ‘Topaz’. *Not Bot Horti Agrobot* 40:113–118.
37. Ghanbari A (2014) Impacts of plant growth regulators and culture media on in vitro propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Iran J Genet Plant Breed* 3(1):11–20
38. Zhang X, Qin Y, Liang D, Zou YJ, Ma FW (2014) Enhancement of in vitro shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock G.41. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50:263–270.
39. Amiri EM, Elahinia A (2011a) Optimization of medium composition for apple rootstocks. *Afr J Biotech* 10:3594–3601.

40. Castillo A, Cabrera D, Rodríguez P, Zoppolo R, Robinson T (2015) In vitro micropropagation of CG41 apple rootstock. *Acta Hort* 1083:569–576.
41. Dastjerd ZH, Jabbarzadeh Z, Marandi RJ (2013) Interaction effects of chitosan, benzyladenine, and gibberellic acid on in vitro proliferation of M26 apple rootstock. *Hortic, Env Biotechnol* 54:538–547.
42. Pathak H, Dhawan V (2010) Molecular analysis of micropropagated apple rootstock MM111 using ISSR markers for ascertaining clonal fidelity. *Acta Hort* 865:73–80.
43. Pathak H, Dhawan V (2012a) Evaluation of genetic fidelity of in vitro propagated apple (*Malus × domestica* Borkh.) rootstock MM 106 using ISSR markers. *Acta Hort* 961:303–310.
44. Pathak H, Dhawan V (2012b) Influence of different carbohydrate sources on in vitro shoot proliferation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) rootstocks M 7 and MM 111. *Acta Hort* 961:311–317.
45. Pathak H, Dhawan V (2012c) ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 48:137–143.
46. Cheng LL, Zhou R, Reidel EJ, Sharkey TD, Dandekar AM (2005) Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO<sub>2</sub> assimilation in apple leaves. *Planta* 220:767–776.
47. Bahmani R, Gholami M, Abdollahi H, Karami O (2009) The effect of carbon source and concentration on in vitro shoot proliferation of MM.106 apple rootstock. *Fruit, Vegetable Cereal Sci Biotechnol* 3(1):35–37
48. Bahmani R, Gholami M, Mozafari AA, Alivaisi R (2012) Effects of salinity on in vitro shoot proliferation and rooting of apple rootstock MM.106. *World Applied Sci J* 17:292–295
49. Wang HY, He SL, Tanaka M, Van PT, Teixeira da Silva JA (2012) Effect of IBA concentration, carbon source, substrate, and light source on root induction ability of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets in vitro. *Eur J Hort Sci* 77:122–128

50. Pereira-Netto AB, Galagovsky LR, Ramirez JA (2012a) Brassinosteroid-driven stimulation of shoot formation and elongation: application in micropropagation. In: Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health, pp 26–34.

51. Pereira-Netto AB, Meneguim RG, Biz A, Silveira JLM (2012b) A galactomannan-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the Marubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) is not related to the degradation of the exogenous galactomannan. Appl Biochem Biotechnol 166:197–207