

## ВЛИЯНИЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ПОБЕГОВ ФУНДУКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ ЭКСПЛАНТОВ *IN VITRO*

Рахмангулов Р. С., Маляровская В. И., Самарина Л. С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,  
г. Сочи, Россия, e-mail: rakhmaruslan@yandex.ru

Основными проблемами введения в культуру *in vitro* побегов фундука является высокая степень эндогенной грибной контаминации, фенольное окисление тканей и некротические поражения эксплантов вследствие поверхностной стерилизации. В связи с этим, цель данной работы – определить влияние предобработки фунгицидами на эффективность получения стерильной культуры эксплантов фундука. В результате исследований было выявлено, что при использовании предобработки побегов фундазолом процент стерильных жизнеспособных эксплантов составил 16,6–56 %, в зависимости от способа стерилизации. В вариантах без фундазола выход стерильных эксплантов составил 0 %. Из всех испытанных вариантов стерилизации наилучшим оказалась обработка побегов 10%-ной белизной 7 мин, при этом выход стерильных жизнеспособных эксплантов составил 56 %, некроз 10 % и контаминация 33,3 %. Полученные результаты будут полезны для создания депонированной коллекции ценных генотипов фундука *in vitro* и разработки протоколов микроразмножения.

**Ключевые слова:** *Corylus avellana*, микроразмножение, асептическая культура, деконтаминация, гипохлорит натрия.

Орехоплодные культуры представляют значительный интерес и перспективу развития в сельскохозяйственном секторе России. Одной из таких культур являются виды и сорта древовидных кустарников рода Лещина (*Corylus L.*), больше всего известные как фундук. Представители данного рода распространены повсеместно на территории Европы, Кавказа, Северной Америки и на Среднем Востоке, где выращиваются в промышленном масштабе. Обширные и наукоёмкие данные по возделыванию фундука накоплены за длительное время во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур (ВНИИЦиСК), г. Сочи [2–5, 8–13].

Для большинства широко известных зарубежных сортов фундука подобраны полные циклы клонального микроразмножения. Однако разработанные протоколы по клональному микроразмножению лещины

сортоспецифичны и значительно отличаются в составах питательных веществ в зависимости от сорта. В России же и странах СНГ сведения по микроразмножению видов и сортов рода *Corylus* незначительны. Так, А. А. Алиханова и А. Г. Юсуфов [1], культивировали семядоли *C. avellana* (L.) Karst. с целью получения морфогенного каллуса для изучения процессов регенерации. В Национальном дендрологическом парке Софиевка (Украина) получен опыт клонального микроразмножения *C. colurna* Koch. [19]. Имеются данные по введению в культуру *in vitro* пазушных почек *C. avellana*, авторами получены стерильные листовые зачатки [6, 7]. В целях сохранения природного генофонда *C. colurna* и *C. avellana* изучены некоторые вопросы введения эксплантов в условия *in vitro* [16, 19].

Зарубежные источники изобилуют многочисленными данными о культуре тканей генотипов рода *Corylus* в условиях *in vitro*. За длительный период исследований данного вопроса многие научные коллективы добились значительных результатов. Ряд авторов сообщают о положительных результатах микроразмножения побегов фундука [14, 18, 20, 22]. Однако культивирование растительных тканей фундука в условиях *in vitro* на практике осложняется контаминацией бактериальными и грибными патогенами, низким коэффициентом размножения, окислением исходных эксплантов, избытком фенольных соединений, а также некрозом тканей эксплантов от чрезмерного токсичного воздействия стерилизующих веществ [18, 22].

Процесс поверхностной стерилизации для получения стерильных эксплантов у многих древесных культур трудоёмкий. Введение материала с применением традиционных способов показывает низкие результаты. Для увеличения числа введённых эксплантов, последние берутся с маточных растений, которые выращиваются в контролируемых тепличных условиях [15]. Интенсивный уход за такими горшечными растениями позволял снижать степень заражения эксплантов на 20 %, в противном случае, инфицирование может составлять до 90 %, что ограничивает преимущество культуры *in vitro* [14].

При отсутствии доступа к омоложенному и оздоровленному маточнику, как источнику эксплантов, необходим поиск альтернативных способов предобработки вегетативных тканей для повышения эффективности введения в стерильную культуру генотипов фундука. Поэтому цель данного исследования выявить эффективность поверхностной стерилизации и предобработки побегов фунгицидами для деконтаминации на этапе введения фундука в стерильную культуру *in vitro*.

**Объекты и методы исследований.** Молодые побеги фундука были получены из коллекционных насаждений ВНИИЦиСК (рис. 1. А, Б). Предобработка растительного материала фундука сорта 'Трапезунд' производилась с использованием  $\frac{1}{2}$  концентрации фундазола за 7 дней перед введением в стерильную культуру. Перед введением в стерильную культуру побеги промывали в проточной воде в течение 20 минут с последующей стерилизацией с использованием сулемы, белизны, велтолена в различных концентрациях и экспозициях. После чего экспланты промывали стерильной дистиллированной водой трижды и помещали на питательную среду  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением агара – 6 г/л, сахарозы – 30 г/л, рН 5,8. Первую неделю культивировали в темноте при температуре +18 °С, затем помещали в стандартные условия освещения 5 000 лк с фотопериодом 16/8.

Учёты роста проводили каждые 10 дней. Опыты проводили в трёхкратной повторности, в каждой повторности не менее 25 пробирок.

**Результаты и их обсуждение.** По данным зарубежных коллег качество маточной коллекции и источник эксплантов является решающим фактором успешной инициации асептической культуры фундука. В нашем случае в отсутствии омоложенного маточника предобработка побегов являлась единственно доступным способом подготовки эксплантов для введения в условия *in vitro*. Ранее было показано, что наиболее предпочтительны в качестве эксплантов боковые почки фундука в сравнении с апикальными, т. к. последние более чувствительны к стерилизации и погибают в течение нескольких дней культивирования [11]. В наших первичных рекогносцировочных результатах апикальные экспланты также погибали.

В последующем, при использовании предобработки побегов фундазолом процент стерильных жизнеспособных эксплантов с латеральными почками составил 16,6–56 %, в зависимости от способа стерилизации. В вариантах без фундазола выход стерильных эксплантов составил 0 % (табл. 1). Несмотря на предобработку фундазолом и поверхностную стерилизацию основной причиной гибели эксплантов являлась высокая степень грибной контаминации, приводящая к гибели 33–70 % эксплантов (в вариантах с использованием фундазола) и 70–90 % (в вариантах без предобработки фундазолом) (рис. 1. В).

Из всех испытанных вариантов, наилучшим вариантом стерилизации оказалась обработка побегов 10%-ной белизной 7 мин. При этом выход стерильных жизнеспособных эксплантов составил 56 %, некроз 10 % и контаминация 33,3 %. Наименее эффективным способом стерилизации было использование стандартного раствора сулемы (0,15%-ный), в результате чего выжили лишь 16,6 % эксплантов. Damiano et al. [16] наблюдали

контаминацию или некроз в 95 % культивируемых эксплантов собранных в период май–сентябрь. На частоту контаминации оказывает влияние не только сезон, но и другие факторы, такие как строение почки, которое делает стерилизацию сложной [21]. Исследователи изучали различные меры борьбы с контаминацией. Согласно данным *Vacchetta et al.* [14] и *Yu, Reed* [22], степень контаминации может быть снижена на 20–30 % при использовании горшечных растений в качестве источника эксплантов вместо полевых. *Diaz-Sala et al.* [17] и *Damiano et al.* [16] сообщали, что хранение веток в холоде может значительно уменьшить контаминацию и увеличить морфогенный потенциал. Хранение эксплантов при 5 °С в течение 3 недель давало 50 % стерильных побегов по сравнению с 30 % при обычном введении.

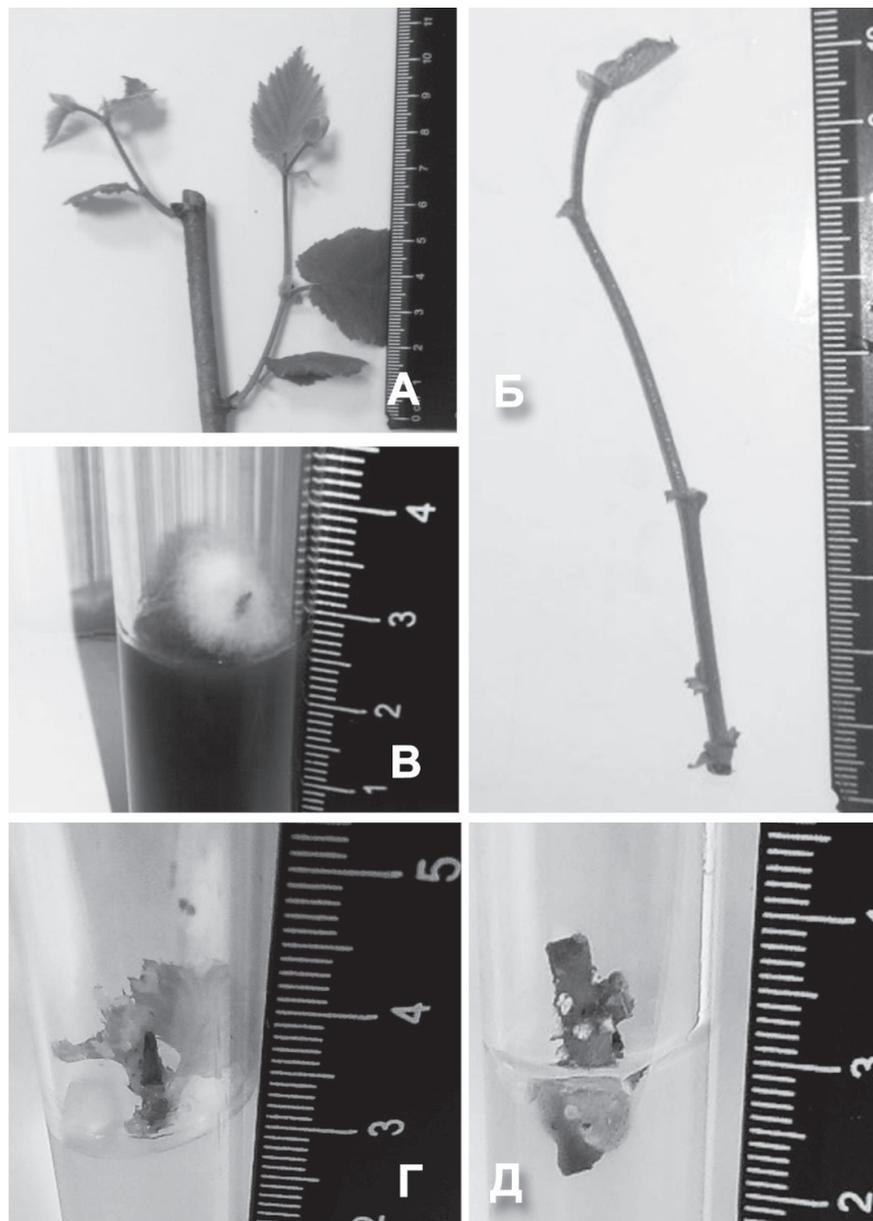
Таблица 1

**Влияние способа стерилизации  
на эффективность введения эксплантов фундука *in vitro***

№ п/п	Пред-обработка фундазолом	Вариант опыта	Некроз, %	Контаминация, %	Стерильных эксплантов, %
1	да	0,15%-ная сулема 7 мин	13,3	70,0	16,6
2		0,3%-ная сулема 5 мин	13,3	63,3	23,3
3		10%-ная белизна 7 мин	10,0	33,3	56,6
4		3%-ный велтолен 15 мин	-	60,0	40,0
5	нет	10%-ная белизна 7 мин	10	90	0
6		10%-ная белизна 15 мин	30	70	0

Было выявлено, что сочетание стрептомицина с гентамицином или стрептомицина с тиментином эффективны для устранения всех бактериальных штаммов, обнаруженных из загрязнённой ткани фундука. Для получения асептической культуры и освобождения от эндогенного загрязнения необходима в 3–4 раза более высокая концентрация антибиотиков. Было

обнаружено, что антибиотики уменьшают заражение, но при высокой концентрации они фитотоксичны. Необходимо проведение дополнительных исследований для обоснования использования антибиотиков в питательной среде при получении чистой культуры фундука.



А – побег фундука; Б – эксплант перед этапом стерилизации;  
В – инфицированный эксплант; Г, Д – жизнеспособные, стерильные экспланты

**Рис. 1.** Введение эксплантов фундука в стерильную культуру

Некроз отмечался несколькими авторами как серьёзная проблема в культуре фундука *in vitro* [16]. Bassil et al. [15] отмечали, что использование этанола для поверхностной стерилизации повышает выход фенолов, приводящий к некрозу тканей. Холодовая предобработка ветвей перед введением в культуру значительно снижает окисление в тканях [17]. Предварительное вымачивание эксплантов в антиоксидантах, таких как аскорбиновая кислота, не имело эффекта для фенольного окисления [22]. Damiano et al. [16] сообщал, что одной из основных трудностей на этапе введения для культуры фундука *in vitro* является некроз почек. Основными причинами некроза является использование жёсткой стерилизации и отсутствие надлежащих компонентов в питательной среде. Было обнаружено, что удаление кроющихся чешуек с почек после стерилизации и перед введением благоприятно сказывалось для защиты почки от поражения химическими веществами и уменьшения некроза тканей. К тому же, культивирование изолированных почек обеспечивает более высокий процент здоровых эксплантов. Согласно данным Vacchetta et al. [14] наибольший процент выхода стерильных жизнеспособных эксплантов (60 %) был получен при стерилизации гипохлоритом Na в сочетании с мертиолятом Na. В нашей работе максимальный процент выхода стерильных эксплантов составил 56 %, что близко к результатам Vacchetta et al. [14]. Применение указанных техник предобработки побегов, может быть эффективно для получения стерильной культуры микропобегов фундука.

**Заключение.** В результате проведённых исследований выявлены способы преодоления эндогенной контаминации эксплантов фундука для введения его в стерильную культуру *in vitro*. Определён оптимальный способ стерилизации и подготовки побегов, а также намечены пути повышения эффективности культивирования растительного материала в условиях *in vitro*. Полученные результаты будут актуальны при создании депонированной коллекции ценных генотипов фундука *in vitro* и разработки протоколов микроразмножения.

#### Библиографический список

1. Алиханова А.А., Юсуфов А.Г. Использование семядолей для микрклонального размножения лещины (*Corylus avellana* L.) // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы IX Международной конференции, 8-12 сентября 2008 г. – Звенигород: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 16. – ISBN: 978-985-6777-74-8.
2. Карачанский А.Т., Чепурной В.С., Махно В.Г. Совершенствование сортимента для промышленного фундуководства на Юге России // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2017. – № 47(05). – С. 68-79. – ISSN: 2219-5335.
3. Кожевникова А.М., Белоус О.Г. Устойчивость сортов фундука во влажных субтропиках России // Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке: мат. Межд. науч.-метод. конф. – Мичуринск-Наукоград РФ, 2011. – С. 205-210.
4. Кожевникова А.М., Белоус О.Г. Характеристика пигментного аппарата листьев различных сортов фундука во влажных субтропиках России // Субтропическое и декора-

- тивное садоводство: сб. науч. раб. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Вып. 47. – С. 178-182. – ISSN: 2225-3068.
5. Кожевникова А.М., Белоус О.Г. Физиологическая характеристика и биохимический состав ореха фундука в зоне влажных субтропиков России // Современные проблемы биологии, экологии и химии: мат. III международной науч.-практ. конференции. – Запорожье, 2012 – С. 25-26.
  6. Магомедалиева В.К., Алиева З.М. Перспективы размножения редких и исчезающих видов растений *in vitro* // Вест. Дагестанского гос. унив. – 2012. – № 6. – С. 167-171. – ISSN: 2542-0321.
  7. Малахова К.В., Марамохин Э.В. Некоторые особенности введения в культуру *in vitro* сортовых форм *Corylus avellana* (L.) H. Karst. // Актуальные проблемы ботаники и охраны природы: мат. Междун. науч.-практич. конфер., посв. 150-летию проф. Г.Ф. Морозова, 28-30 ноября 2017 г. – Симферополь, 2017. – С. 170-172. – ISBN: 978-5-906962-78-2.
  8. Махно В.Г. Использование рода *Corylus* в декоративном и промышленном садоводстве // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. раб. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2014. – Вып. 50. – С. 232-235. – ISSN: 2225-3068.
  9. Махно В.Г., Горобец С.А. Продукционный потенциал сортов фундука нового поколения // Садоводство и виноградарство. – 2013. – № 6. – С. 23-27. – ISSN: 0235-2591,
  10. Махно В.Г., Хахо К.И. Культура фундука и проблемы его возделывания // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. раб. – Сочи: ВНИИЦиСК, 1989. – Вып. 36. – С. 64-71. – ISSN: 2225-3068.
  11. Рахмангулов Р.С., Малярская В.И., Самарина Л.С., Конинская Н.Г. К вопросу стерилизации эксплантов древесных и плодовых культур при введении в условия *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2018. – Вып. 64. – С. 116-120. – ISSN: 2225-3068.
  12. Рындин А.В., Мохно В.С. Генетические ресурсы садовых растений в субтропиках России и возможности их использования // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Вып. 47. – С. 13-22. – ISSN: 2225-3068.
  13. Рындин А.В., Терешкин А.С. Состояние и перспективы развития субтропического растениеводства на Черноморском побережье России // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2012. – Вып. 46. – С. 13-25. – ISSN: 2225-3068.
  14. Vacchetta L., Aramini M., Bernardini C., Rugini E. *In vitro* propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources // Hort. Sci. – 2008. – Vol. 43. – P. 562-566. – ISSN: 0862-867X.
  15. Bassil N., Mok D., Mok M., Rebhuhn B. Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana* // Acta Horticulturae (ISHS). – 1991. – Vol. 300. – P. 137-140. – ISSN: 0567-7572.
  16. Damiano C., Caternaro J., Giovinazzi J., Fratarella A. and Caboni E. Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.) // Acta Horticulturae (ISHS). – 2005. – Vol. 686(1). – P. 221-226. – ISSN: 0567-7572.
  17. Díaz-Sala C., Rey M., Rodríguez R. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1990 – Vol. 23(3). – P. 151-157. – ISSN: 0167-6857.
  18. Hand C.R., Wada N., Stockwell V., Reed B.M. Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2016. – ISSN: 1054-5476. – doi: 10.1007/s11627-016-9791-4
  19. Kosenko I.S., Boyko A.L., Opalko A.I., Nebykov M.V., Tarasenko G.A. Micropropagation of *Corylus colurna* L. // Acta Horticulturae (ISHS). – 2009. – Vol. 845. – P. 261-266. – ISSN: 0567-7572.
  20. Nas M.N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation // Turk. J. Agric For. – 2004. – Vol. 28. – P. 189-194. – ISSN: 1300-011X.
  21. Thomson G., Deering T. Effect of cytokinin type and concentration on *in vitro* shoot proliferation of hazelnut (*Corylus avellana* L.) // N. Z. J. Crop Hortic. Sci. – 2011. – Vol. 39(3). – P. 209-213. – ISSN: 0114-0671.
  22. Yu X., Reed B.M. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus species*) // Hort. Sci. – 1995. – Vol. 30(1). – P. 120-123. – ISSN: 0862-867X.

**THE EFFECT OF HAZELNUT SHOOTS PRETREATMENT  
ON THE EFFICIENCY OF INTRODUCING EXPLANTS  
INTO *IN VITRO* CULTURE**

**Rakhmangulov R. S., Malyarovskaya V. I., Samarina L. S.**

*Federal State Budgetary Scientific Institution  
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,  
с. Sochi, Russia, e-mail: rakhmaruslan@yandex.ru*

The main problems of introducing hazelnut into *in vitro* culture are a high degree of endogenous fungal contamination, phenolic oxidation of tissues and necrosis of explants due to surface sterilization. In this regard, the purpose of present work is to reveal the effect of fungicide pretreatment on the effectiveness of obtaining aseptic culture of hazelnut explants. As a result of the research, it was found that when using pre-treatment of shoots by fungicides, the percentage of aseptic viable explants was 16.6–56 %, depending on sterilization procedure. In variants without fungicide pretreatment, the rate of aseptic explants was 0 %. The best variant of sterilization was the treatment of shoots with 10 % Bleach for 7 min, while the rate of sterile viable explants was 56 %, necrosis 10 % and contamination 33.3 %. The results obtained will be useful for creating *in vitro* collection of valuable hazelnut genotypes and for the development of micropropagation protocols.

**Key words:** *Corylus avellana*, micropropagation, aseptic culture, decontamination, sodium hypochlorite.

УДК 635.9:631.52:581.143.6

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЛИЛИЙ**

**Соколова М. А.**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научный центр им. И. В. Мичурина»,  
г. Мичуринск, Россия, e-mail: marina-111012@rambler.ru*

В статье представлены результаты клонального микроразмножения сортообразцов лилий, относящихся к разным разделам Международной классификации гибридных лилий: Азиатским и Трубчатым гибридам. Приведены экспериментальные данные по стерилизации растительного материала лилий на этапе введения в культуру *in vitro*. На этапе собственно микроразмножения, в зависимости от минерального состава питательных сред, отмечены сортовые особенности, отразившиеся на регенерации, образовании, а также, на дальнейшем росте и развитии адвентивных луковичек лилий.

**Ключевые слова:** лилии, клональное микроразмножение, стерилизация, контаминация, регенерация, коэффициент размножения.