

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 004.416.3:661.162.6:631.53:674.031.632.143

DOI: 10.36305/2712-7788-2021-4-161-36-46

**РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ САДОВЫХ ФОРМ ФУНДУКА
(*CORYLUS SP.*)**

**Эдие Сеитвелиевна Сеитмамутова¹, Владислав Вячеславович Федоров¹,
Игорь Владимирович Гавриленко¹, Юлия Сергеевна Матяш¹,
Ангела Викторовна Гавриленко¹, Дмитрий Александрович Шанин¹,
Павел Алексеевич Хватков^{1,3}, Сергей Владимирович Долгов^{1,2,3}**

¹ Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН
298648, Р Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52

² Филиал ФГБУН Института биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
142290, Московская область, Пущино, проспект Науки, 6

³ ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии»
127550, г. Москва, улица Тимирязевская, 42
E-mail: khvatkov1987@gmail.ru

Фундук является экономически важной в мире орехоплодной культурой. Размножение традиционным способом сортовых саженцев фундука дорогостояще и трудоемко в виду потребности в огромных площадях маточников для черенкования и низкой укореняемости черенков. Перспективной является разработка и внедрение технологии клонального микроразмножения *in vitro* фундука. Использование данного метода способствует массовому получению однородного, чистого от инфекций посадочного материала фундука для закладки маточников. В ходе исследований нами был оптимизирован протокол клонального микроразмножения трех сортов фундука. Было установлено, что для культивирования исследуемых сортов наиболее сбалансированной по минеральному составу является среда DKW дополненная 3,5 мг/л 6- БАП, 1,0 мг/л ГК и 0,3 мг/л ИУК; модификация среды NRM дополненная 1,0 мг/л ГК + 1,0 мг/л ИУК + 2,0 мг/л ИМК эффективно способствует ризогенезу из эксплантов; ГК проявила синергетическое воздействие совместно с ИУК на укоренение микропобегов фундука, к 4-ой неделе культивирования количество побегов обладающих корнями достигало 90-100%; в условиях климокамеры с использованием субстрата торф с песком (50:50) эффективность адаптации к почвенным условиям составила у сорта КАХ-29 92%, у сорта Закаталы 80%, а у сорта Хачмас 36%.

Ключевые слова: адаптация; клональное микроразмножение; питательные среды; регуляторы роста; размножение; укоренение; фундук; *in vitro*; *in vivo*

Введение

Современное состояние продовольственного рынка Российской Федерации ориентирует на восстановление и увеличение производства отечественного сырья (Карачанский, 2017). Фундук является экономически важной орехоплодной культурой и стоит в одном ряду с грецким орехом, миндалем и кешью. В предыдущие периоды основные потребности отечественной кондитерской и парфюмерной промышленности в фундуке удовлетворяли за счёт импорта из стран Европы (Италия), Турции, США Грузии (ФАО, 2007). С целью импортозамещения ядер фундука актуальным становится вопрос посадки саженцев растений для промышленных садов в регионах возделывания РФ (Краснодарский край, Республика Крым). Размножение традиционным способом

сортовых саженцев фундука дорогостояще и трудоемко в виду потребности в огромных площадях маточников для черенкования, низкой укореняемости черенков и высокой трудоемкости, что обуславливает низкую производительность питомников. Поэтому перспективной является разработка и внедрение технологии клонального микроразмножения *in vitro* фундука. Использование данного метода способствует получению массового однородного, чистого от инфекций посадочного материала фундука для закладки маточников.

Ряд авторов отмечают, что на увеличение коэффициента размножения в культуре *in vitro* различных сортов фундука положительное влияние оказывает минеральный состав питательных сред DKW (Driver, Kuniyuki, 1984), WPM (Lloyd, McCown, 1980), MS и их модификаций (Nas, Read, 2001).

Многими авторами проводились исследования по подбору оптимальных концентраций регуляторов роста для повышения эффективности клонального микроразмножения фундука. Среда MOLT (Damiano *et al.*, 2005), обогащенная 1,5 или 2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (6 –БАП) + 0,1 мг /л гиббереллиновой кислоты (ГК₃) + 0,01 мг/л индол-3-масляной кислоты (ИМК), оказалась эффективной для размножения фундука. Работы по изучению влияния различных концентраций 6 – БАП на эффективность микроразмножения фундука демонстрируют разнящиеся результаты. Оптимум воздействия 6 – БАП приходился на существенно различающиеся концентрации: 1,0 мг/л; 1,5 – 3,0 мг/л; 4,5 мг/л; 5 мг/л (Bassil *et al.*, 1991; Nas, Read, 2004; Damiano *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2012; Garrison *et al.*, 2013). Отмечено, что другие регуляторы роста, такие как кинетин и зеатин не столь эффективны для размножения фундука по сравнению с 6 – БАП (Andres *et al.*, 2002; Yu, Reed, 1995). Добавление в среду комбинации ИМК 0,01 мг/л или ИУК 0,01 мг/л совместно с ГК 0,1 мг/л и 6-БАП приводило к увеличению коэффициента размножения и удлинению побегов фундука (Damiano *et al.*, 2005; Diaz-Sala *et al.*, 1990; Bassil *et al.*, 1991).

Ризогенез побегов фундука *in vitro* получали путем культивирования их на средах (½ MS, DKW, MOLT, NRM), содержащих ИМК (0,1 мг/л; 0,5мг/л; 1 мг/л или 2 мг/л) (Nas, Read, 2001; Damiano *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008). Корнеобразование возможно также путем депонирования базальной части побегов в растворе ИМК (0,2-2мг/л; 0,1-1 мг /л) в течение некоторого времени (≈10 – 15 сек), а затем переноса этих побегов на среду без ауксина (Yu, Reed, 1993). Эффективность укоренения фундука при любом способе варьировала от 64 до 100% в зависимости от сорта и концентрации регуляторов роста. Стимулирующее действие ИУК, ИУК выявлено не было (Yu, Reed, 1993; Nas, Read, 2001; Damiano *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008).

В виду выделения орехоплодными культурами в процессе жизнедеятельности различных метаболитов фенольной природы, которые по мере накопления в окружающем слое среды приводят к ингибированию ростовых процессов, ряд авторов, для увеличения эффективности микроразмножения, обогащали среды добавками с антиоксидантной активностью (Uchendu *et al.*, 2011).

Несмотря на обширные и иногда противоречивые исследования, размножение фундука все еще остается сложной задачей и требует дополнительных исследований. На данный момент не существует единого протокола клонального микроразмножения для садовых форм фундука.

В связи с чем, целью данной работы явилась разработка и оптимизация эффективного протокола клонального микроразмножения в культуре тканей *in vitro* ранее неизученных селекционно – ценных садовых форм фундука (*Corylus sp.*) сортов азербайджанской селекции (Хачмас, Закаталы и КАХ-29).

Условия экспериментов

В экспериментах использовали стерильные донорные растения садовых форм фундука сортов азербайджанской селекции (Хачмас, Закаталы и КАХ-29). Маточные микропобеги фундука, культивировали на агаризованной среде DKW, дополненной 6-БАП в концентрации 5,0 мг/л совместно с 0,3 мг/л ИУК и 1,0 мг/л ГК.

Для повышения эффективности клонального микроразмножения фундука в условиях *in vitro* был осуществлен опыт по подбору наиболее эффективной комбинации среды и регуляторов роста. Использовали 4 типа среды (MS (Murashige, Skoog, 1962), WPM (Lloyd, McCown, 1980), DKW (Driver, Kuniyuki, 1984), MOLT (Damiano *et al.*, 2005), которые содержали различные источники углеводов (глюкоза 3% и сахароза 3%), дополненные 6- БАП в концентрациях 2,0, 3,5 и 5,0 мг/л, совместно с 1,0 мг/л ГК и 0,3 мг/л ИУК (24 варианта в трехкратной повторности для каждого сорта). Пятиузловые микрочеренки растений каждого сорта помещали горизонтально на агаризованные питательные среды в количестве 10 штук в один культивационный контейнер. Эксперимент длился 3 месяца. Ежемесячно проводили учет биомассы растений при пересадке на свежие среды. В качестве критерия оценки результатов эксперимента был принят показатель времени удвоения биомассы эксплантов, который вычислялся по формуле:

$$DT = \frac{\ln 2}{(\ln x_{t1} - \ln x_{t0}) * 1000 / t1}, \text{ где:} \quad (1)$$

x_{t0} – суммарная биомасса эксплантов в каждой повторности, каждого варианта в начале каждого месяца (г); x_{t1} – суммарная биомасса эксплантов в каждой повторности, каждого варианта в конце каждого месяца, замеряемая при пересадке на свежие среды (г); $t1$ – период культивирования эксплантов (сут.) (Ziegler *et al.*, 2015).

Для изучения влияния органических добавок с антиоксидантной активностью (аскорбиновая и ацетилсалициловая кислоты) с целью устранения выделения различных метаболитов фенольной природы, приводящих к ингибированию ростовых процессов фундука, пятиузловые микропобеги растений каждого исследуемого сорта горизонтально размещали на агаризованные питательные среды (DKW, сахароза 3%, 3,5 мг/л 6- БАП, 1,0 мг/л ГК и 0,3 мг/л ИУК) в количестве 10 штук в один контейнер. Было задействовано 10 вариантов (3 концентрации аскорбиновой кислоты (6,0, 9,0 и 12,0 мг/л) совместно с 3 концентрациями ацетилсалициловой кислоты (1,0, 2,0 и 3,0 мг/л) и контрольный вариант без добавления оных) в трехкратной повторности для каждого сорта. Продолжительность эксперимента составила 3 месяца, критерием оценки результата служил показатель количества полученных микропобегов с каждого варианта в эксперименте.

Для укоренения и элонгации микропобегов провели изучение влияния НУК (0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 мг/л) и ИМК (2,0, 4,0 и 8,0 мг/л) как совместно с 1,0 мг/л ГК, так и без него. Учет эффективности ризогенеза проводили спустя 4 недели. Микрорастения помещали вертикально на агаризованные питательные среды. Всего было протестировано в трехкратной повторности для каждого сорта не менее 30 растений для каждого варианта комбинаций регуляторов роста (см. таблица 1). Далее, для повышения эффективности укоренения микропобегов, изучали модификации среды NRM [в связи с низким содержанием в минеральном составе солей железа и высоким содержанием ионов меди согласно авторской прописи (Nas, Read, 2004)]. Микрорастения помещали вертикально на агаризованные питательные среды. Всего было протестировано в трехкратной повторности для каждого сорта и варианта в количестве 10 штук в один контейнер 8 вариантов: четыре модификации среды NRM (1 – сахароза 30 г/л, Fe-хелат 0,5 мл/л, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 мг/л – оригинальный состав; 2 –

сахароза 10 г/л, Fe-хелат 2,5 мл/л, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 мг/л; 3 – сахароза 10 г/л, Fe-хелат 2,5 мл/л, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 мг/л; 4 – сахароза 10 г/л, Fe-хелат 5,0 мл/л, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 мг/л) и две комбинации регуляторов роста (ИМК 2,0 и 4,0 мг/л совместно с 1,0 мг/л ГК и 1,0 мг/л НУК). Продолжительность эксперимента составила 1 месяц, учет эффективности ризогенеза проводили каждую неделю.

Этап адаптации производили в климатической камере MLR-352H (Sanyo, Япония). Для этого 25 растений каждого сорта высаживали в кассеты с объемом ячейки 100 мл, заполненные торфом, смесью торфа и агроперлита (80:20), торфа и песка (50:50) и коксового субстрата и торфа (50:50) и помещали в камеру в условия 100% влажности воздуха, при температуре 25°C и 4 кЛюкс освещенности. Далее каждую неделю влажность воздуха снижали на 10% до достижения показателя в 60%. Учет эффективность адаптации растений к условиям *in vivo* осуществляли спустя две недели роста растений при 60% влажности воздуха, температуре 25°C и 4 кЛюкс освещенности. Продолжительность эксперимента составила 6 недель.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом малых выборок с вычислением среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего арифметического (m). Для определения достоверности различий между сравниваемыми пробами рассчитывали коэффициент Стьюдента t :

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, \text{ где:} \quad (2)$$

M_1 и M_2 – средние арифметические двух сравниваемых групп; m_1 и m_2 – стандартные ошибки средних арифметических двух сравниваемых групп. Полученное значение t сравнивали с табличным значением, согласно количеству степеней свободы для каждого эксперимента.

Результаты и обсуждение

В результате исследований по изучению влияния комбинации среды и регуляторов роста на эффективность клонального микроразмножения фундука не было выявлено статистически достоверных различий в интенсивности прибавки биомассы в зависимости от сорта. Все исследуемые сорта реагировали схожим образом на изменение состава сред и регуляторов роста. Наиболее быстрое удвоение биомассы (от 16,9 до 22,3 суток) было отмечено в варианте культивирования фундука на среде DKW, дополненной сахарозой в концентрации 3% и регуляторами роста 6-БАП, ГК и ИУК в концентрациях 3.5 мг/л, 1.0 мг/л и 0.3 мг/л, соответственно. Отдельно стоит отметить, что по результатам первого месяца культивирования, угнетающее действие несбалансированных по минеральному составу сред было недостаточно выражено. Однако ко второму и третьему месяцу проявилось в более чем 3-4 кратном снижении скорости размножения фундука. Популяции фундука, культивируемые на средах с минеральной базой DKW, на протяжении всего эксперимента демонстрировали довольно низкие и статистически неразличимые в пределах варианта результаты, что позволяет заявить об отсутствии угнетающего воздействия данного состава на процессы пролиферации тканей исследуемых сортов фундука (см. рис. 1).

В результате исследований эффективности применения антиоксидантных добавок для размножения фундука было установлено, что обогащение среды 9 мг/л аскорбиновой кислоты способно увеличить эффективность размножения фундука в 1,2-1,4 раза. Статистически достоверной разницы в интенсивности увеличения количества побегов в вариантах эксперимента в зависимости от сорта обнаружено не было. Обогащение среды ацетилсалициловой кислотой в исследуемых концентрациях ингибировало

размножения фундука и, в ряде вариантов эксперимента, приводило к более низким показателям количества полученных побегов, даже по сравнению с контрольной группой, культивируемой без каких-либо антиоксидантных добавок в среде (см. рис. 2).

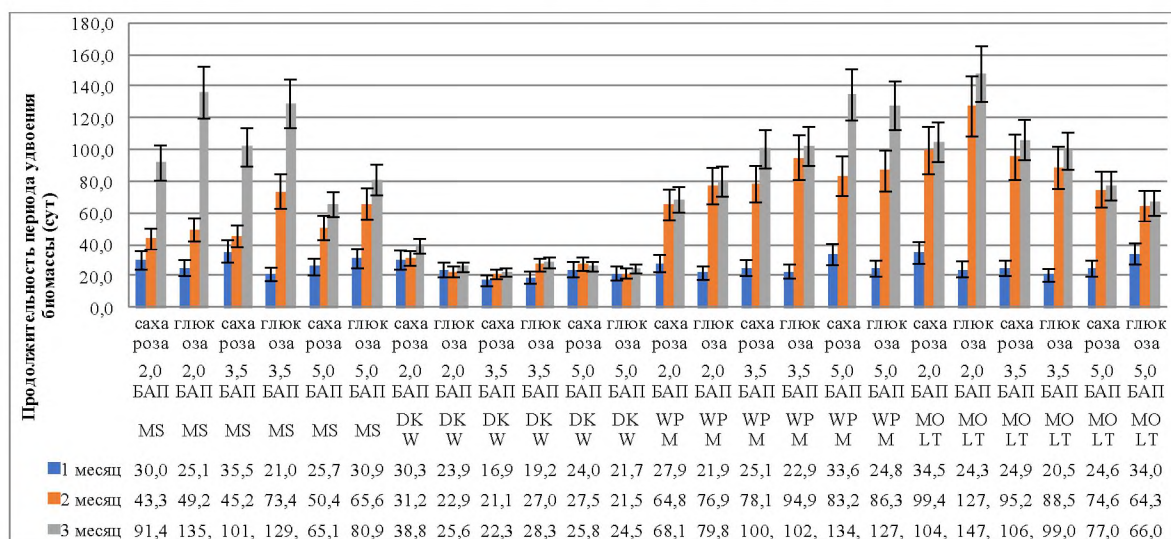


Рис. 1 Влияние типа среды, источника углеводов и концентрации 6-БАП на эффективность клонального микроразмножения фундука (*Corylus sp.*)

Fig. 1 Influence of the type of medium, the source of carbohydrates and the concentration of 6-BAP on the effectiveness of clonal micro-propagation of hazelnuts (*Corylus sp.*)

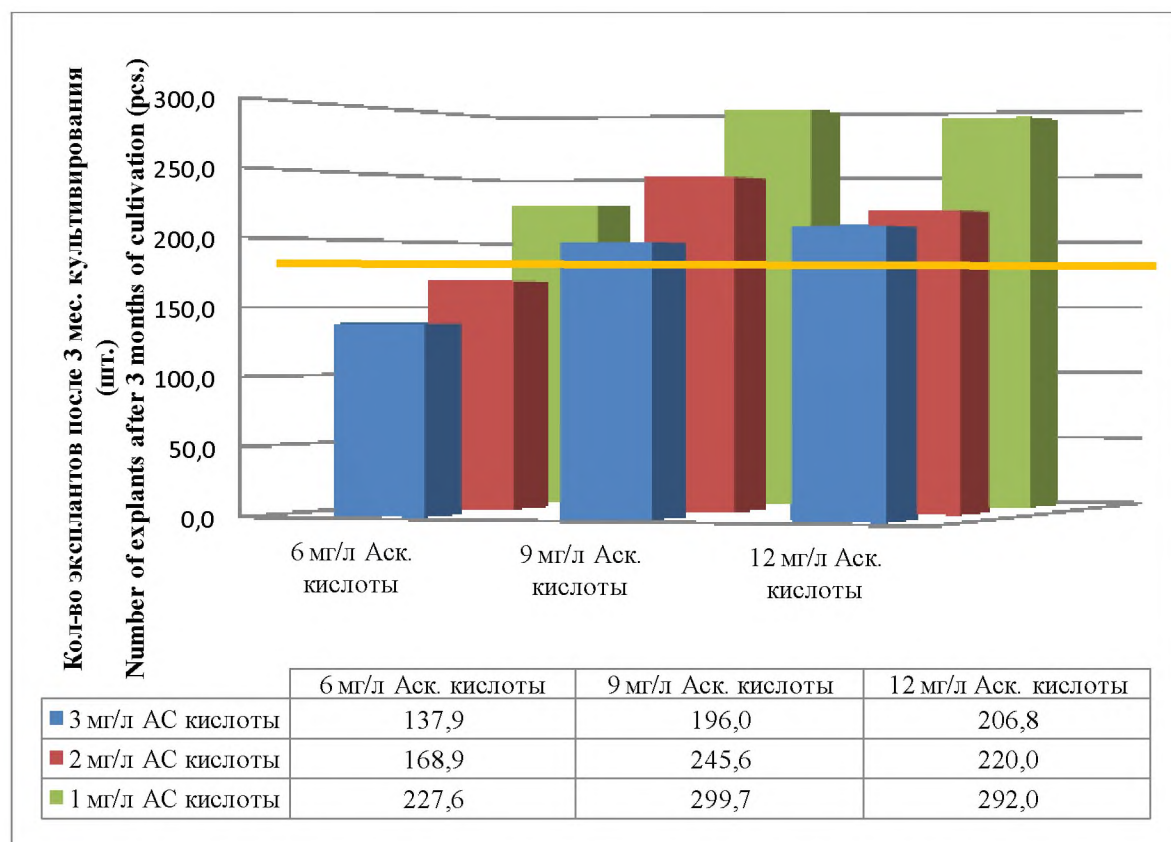


Рис. 2 Влияние аскорбиновой и ацетилсалициловой кислот на эффективность размножения фундука (уровень контроля показан оранжевой линией)

Fig. 2 Effect of ascorbic and acetylsalicylic acids on the efficiency of hazelnut propagation (the control level is shown by the orange line)

В ходе исследования влияния НУК и ИМК как совместно с 1,0 мг/л ГК, так и без него, на эффективность укоренения и элонгации микропобегов фундука было установлено, что НУК в концентрациях от 0,5 до 2,0 мг/л не оказывает положительного влияния на ризогенез ни у одного из исследуемых сортов. ИМК оказывает положительное влияние на корнеобразование у побегов исследуемых сортов. Наиболее эффективная концентрация ИМК составила 4,0 мг/л. Стоит отметить, что корнеобразование сопровождалось каллусогенезом в базальной части побега, что способно оказать негативное влияние на дальнейшую адаптацию побега к условиям *in vivo* (рис. 3). Добавление 1,0 мг/л ГК в среды для укоренения, содержащие ИМК, привело к ингибированию ризогенеза у микропобегов фундука. Так для варианта NRM + 4,0 мг/л ИМК эффективность ризогенеза составила у сортов КАХ-29 84,3%, Закаталы 77,9%, Хачмас 83,2%, то для варианта NRM + 4,0 мг/л ИМК + 1,0 мг/л ГК эффективность укоренения была ниже на 10-14% (КАХ-29 70,0%, Закаталы 63,6%, Хачмас 73,0%). Добавление 1,0 мг/л ГК в среды для укоренения, содержащие НУК, привело к не типичной для данной пары регуляторов роста реакции. ГК в данном эксперименте в принципе не оказал никакого влияния на элонгацию побегов или корней фундука и если в комбинации с ИМК он несколько ингибировал укоренение, то в комбинации с НУК он повысил эффективность укоренения с 0,0 до 55-69%. Так для варианта NRM + 2,0 мг/л НУК + 1,0 мг/л ГК эффективность укоренения составила у сортов КАХ-29 54,8%, Закаталы 64,7%, Хачмас 69,2%. Стоит отметить, что корнеобразование с применением пары НУК+ГК не сопровождалось существенным образованием каллуса в базальной части побега (рис. 3). Применение сложного комплекса регуляторов роста было наиболее эффективно в варианте использования субоптимальных доз НУК и ИМК (половина от оптимальной концентрации обоих ауксинов) совместно с ГК. Так для варианта NRM + 1,0 мг/л НУК + 2,0 мг/л ИМК + 1,0 мг/л ГК эффективность ризогенеза составила у сортов КАХ-29 94,6%, Закаталы 91,2%, Хачмас 89,3% и статистически значимо не возрастала при дальнейшем повышении концентраций регуляторов роста ауксинового принципа действия (таблица 1).



Рис. 3 Влияние ИМК (растение справа) и НУК (растение слева) на образование каллуса в базальной части микропобега фундука (*Corylus sp.*) в процессе укоренения

Fig. 3 The influence of IBA (plant on the right) and NAA (plant on the left) on the development of callus in the basal part of the microshoot of hazelnuts (*Corylus sp.*) during rooting

Таблица 1

Влияние различных регуляторов роста в различных концентрациях и комбинациях на эффективность укоренения микропобегов фундука (*Corylus sp.*)

Table 1

The effect of various growth regulators in various concentrations and combinations on the rooting efficiency of hazelnut microshoots (*Corylus sp.*)

Регуляторы роста (мг/л) Growth regulators (ml/l)	Сорт Cultivar	Всего (шт.) Total (pcs.)	Не укоренились (шт.) / Not rooted (pcs.)	Укоренились (шт.) Rooted (pcs.)	Эффективность укоренения (%) Rooting efficiency (%)
НУК 0,5	Хачмас	37	37	0	0,0
	Закаталы	40	40	0	0,0
	КАХ-29	30	30	0	0,0
НУК 1,0	Хачмас	30	30	0	0,0
	Закаталы	41	41	0	0,0
	КАХ-29	32	32	0	0,0
НУК 1,5	Хачмас	36	36	0	0,0
	Закаталы	39	39	0	0,0
	КАХ-29	34	34	0	0,0
НУК 2,0	Хачмас	35	35	0	0,0
	Закаталы	39	39	0	0,0
	КАХ-29	30	30	0	0,0
НУК 0,5 + ГК 1,0	Хачмас	31	20	11	35,5
	Закаталы	40	22	18	45,0
	КАХ-29	30	25	5	16,7
НУК 1,0 + ГК 1,0	Хачмас	35	22	13	37,1
	Закаталы	25	16	23	54,3
	КАХ-29	30	22	8	26,7
НУК 1,5 + ГК 1,0	Хачмас	36	9	27	75,0
	Закаталы	39	16	23	59,0
	КАХ-29	30	17	13	43,3
НУК 2,0 + ГК 1,0	Хачмас	39	12	27	69,2
	Закаталы	34	12	22	64,7
	КАХ-29	31	14	17	54,8
ИМК 2,0	Хачмас	32	17	15	47,5
	Закаталы	43	20	23	53,3
	КАХ-29	45	11	34	76,2
ИМК 4,0	Хачмас	37	6	31	83,2
	Закаталы	33	7	26	77,9
	КАХ-29	35	5	30	84,3
ИМК 8,0	Хачмас	51	33	18	34,6
	Закаталы	46	40	6	13,3
	КАХ-29	48	36	12	25,6
ИМК 2,0 + ГК 1,0	Хачмас	51	27	24	47,5
	Закаталы	31	14	17	53,3
	КАХ-29	42	10	32	76,2
ИМК 4,0 + ГК 1,0	Хачмас	62	17	45	73,0
	Закаталы	47	17	30	63,6
	КАХ-29	30	9	21	70,0
ИМК 8,0 + ГК 1,0	Хачмас	43	28	15	34,6
	Закаталы	33	29	4	13,3
	КАХ-29	35	26	9	25,6
НУК 1,0 + ИМК 2,0 + ГК 1,0	Хачмас	36	4	32	89,3
	Закаталы	45	4	41	91,2
	КАХ-29	34	2	32	94,6
НУК 1,0 + ИМК 4,0 + ГК 1,0	Хачмас	34	6	28	82,4
	Закаталы	43	4	39	90,7
	КАХ-29	38	3	35	92,1

Для укоренения побегов фундука исследуемых сортов, не требуется серьезно стрессировать растения; модификация среды NRM (сахароза 10 г/л, Fe-хелат 5,0 мл/л, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 мг/л) с выровненными до стандартных для обычных культуральных сред величин содержания ионов железа и меди наиболее эффективно способствует ризогенезу из экплантов (рис. 4); исследованные комбинации регуляторов роста интенсивно способствовали укоренению и к 4-ой неделе культивирования количество побегов обладающих корнями достигало 90-100%; статистически достоверные различия между вариантами комбинаций регуляторов роста обнаружены не были. Наиболее эффективным для укоренения микропобегов фундука *in vitro* представляется использование среды NRM в модификации совместно с 1,0 мг/л ГК + 1,0 мг/л НУК + 2,0 мг/л ИМК (рис. 5).

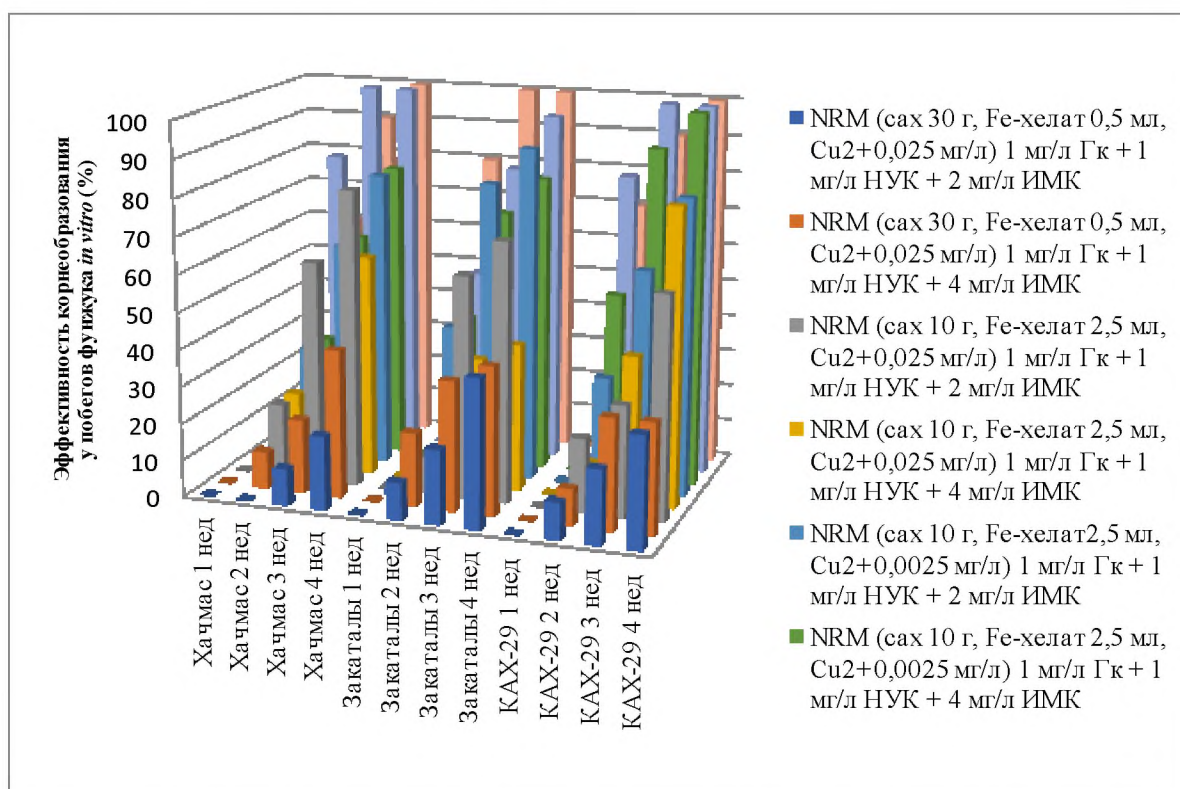


Рис. 4 Влияние модификации среды NRM и концентрации ИМК на эффективность укоренения микропобегов фундука (*Corylus sp.*)

Fig. 4 Effect of modification of the NRM medium and the concentration of IBA on the rooting efficiency of hazelnut microshoots (*Corylus sp.*)

В условиях климатической камеры уже через неделю у микроклонов фундука сформировалась полноценная эпиблема (рис. 6 а, в) и активизировалась апикальная меристема (рис. 6 б, в). Наиболее эффективным составом для адаптации и дальнейшего культивирования фундука оказалась смесь торфа и песка (50:50). Эффективность адаптации к почвенным условиям составила у сорта КАХ-29 92%, у сорта Закаталы 80%, а у сорта Хачмас только 36%. По всей видимости, для данного сорта необходимы дальнейшие исследования по оптимизации условий адаптации микроклонов.

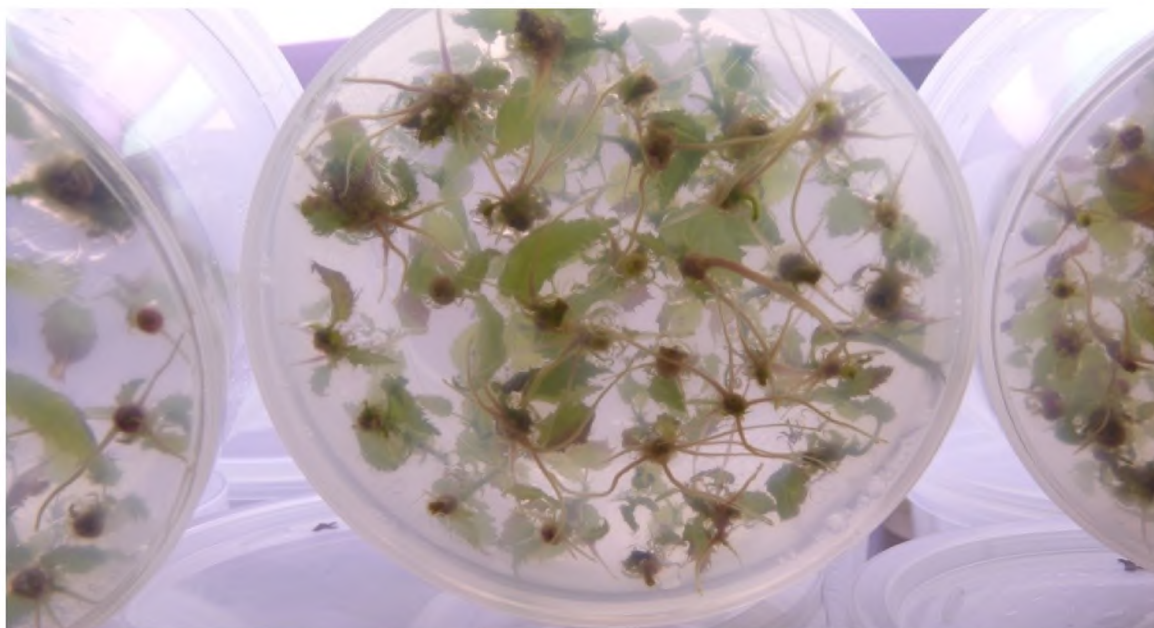


Рис. 5 Ризогенез побегов фундука сорта КАХ-29 на NRM в среде NRM в модификации совместно с 1,0 мг/л ГК + 1,0 мг/л НУК + 2,0 мг/л ИМК в условиях *in vitro*

Fig. 5 Rhizogenesis of hazelnut shoots of KAH-29 cultivar on NRM in the NRM medium in modification together with 1.0 mg/l GA + 1.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l IBA under *in vitro* conditions



Рис. 6 Адаптация микроклонов фундука сорта КАХ-29 к условиям *in vivo*

Fig. 6 Adaptation of microclones of KAH-29 hazelnuts to *in vivo* conditions

Заключение

В результате проведенных исследований был оптимизирован протокол клонального микроразмножения трех сортов фундука. Было установлено, что для культивирования исследуемых сортов *Corylus sp.* наиболее сбалансированной по минеральному составу является среда DKW (периодом удвоения биомассы от 16,9 до 22,3 суток); модификация среды NRM эффективно способствует ризогенезу из эксплантов; исследованные комбинации регуляторов роста интенсивно способствовали укоренению, к 4-ой неделе культивирования количество побегов обладающих корнями достигало 90-100%; эффективность адаптации к почвенным условиям составила у сорта КАХ-29 92%, у сорта Закаталы 80%, а у сорта Хачмас 36%.

Оптимизация протокола клонального микроразмножения трех сортов фундука позволила в 2018-2019 гг. произвести и передать для адаптации в отделения агротехники и питомниководства декоративных растений "Приморское" ФГБУН «НБС-ННЦ» РАН суммарно 14099 шт. микроклонов фундука.

Благодарности / Acknowledgements

Исследования выполнены на оборудовании УНУ «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» («ФИТОБИОГЕН») ФГБУН "НБС-ННЦ" (Ялта, Россия)".

Литература / References

Карачанский А.Т., Чепурной В.С., Махно В.Г. Совершенствование сортимента для промышленного фундуководства на юге России // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. № 47 (5). С. 68–79.

[Karachansky A.T., Chepurnoy V.S., Makhno V.G. Improving the assortment for industrial hazelnut growing in the South of Russia. *Fruit growing and viticulture of the South of Russia*. 2017. 47 (5): 68–79]

ФАО, 2007 [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://www.fao.org/home/en/>. [Food and Agricultural Organization, 2007 [electronic resource]. – Available at <http://www.fao.org/home/en/>.]

Andres H., Fernandez B., Rodriguez R., Rodriguez A. Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002. Vol. 70 (2). P. 173–180.

Bassil N., Mok D., Mok M., Rebhuhn B. Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana* // *Acta Horticulturae*. 1991. Vol. 300. P. 137–140.

Damiano C., Caternaro J., Giovinnazzi J., Fratarelli A., Caboni E. Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.) // *Acta Horticulturae*. 2005. Vol. 686 (1). P. 221–226.

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.

Driver J.A., Kuniyuki A.H. *In Vitro* Propagation of Paradox walnut Rootstock // *HortScience*. 1984. Vol. 19. P. 507-509.

Gao X., Liu J., Ling Q. Tissue culture and rapid propagation of hybrid hazelnut (*Corylus heterophylla* x *C. avellana*) // *Acta Horticulturae*. 2008. Vol. 771 (2). P. 207–211.

Garrison W., Dale A., Saxena P.K. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA) // *Canadian Journal of Plant Science*. 2013. Vol. 93 (3). P. 511–521.

Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *International Plant Propagators' Society*. 1980. Vol. 30. P. 421-427.

Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

Nas M.N., Read P.E. Micropropagation of hybrid hazelnut: Medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality // *Acta Horticulturae*. 2001. Vol. 556 (36). P. 252–257.

Nas M.N., Read P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts // *Scientia Horticulturae*. 2004. Vol. 101. P. 189–2004.

Shukla M.R., Jones A.M.P., Sullivan J.A., Liu C., Gosling S., Saxena P.K. *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): Potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation // *Canadian Journal of Forest Research*. 2012. Vol. 42 (4). P. 686–697.

Uchendu E.E., Paliyath G., Brown D.C., Sahena P.K. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2011. Vol. 47. P. 710–718.

Yu X., Reed B.M. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus species*) // *Hortscience* 1995. 30(1): 120–123

Ziegler P., Adelmann K., Zimmer S., Schmidt C., Appenroth K.-J. Relative *in vitro* growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants // *Plant Biol.* 2015. Vol. 17 (1). P. 33–41.

Статья поступила в редакцию 23.11.2021 г.

Seitmamutova E.S., Fedorov V.V., Gavrilenko I.V., Matyash Yu.S., Gavrilenko A.V., Shanin D.A., Khvatkov P.A., Dolgov S.V. Development and optimization of the method of clonal micropropagation of garden forms of hazelnuts (*Corylus sp.*) // *Plant Biology and Horticulture: theory, innovation*. 2021. № 4 (161). P. 36–46.

Hazelnuts are an economically important nut crop in the world. Propagation of varietal hazelnut seedlings in the traditional way is expensive and time-consuming due to the need for huge areas for parent plants for cuttings and low level of rooting. The development and implementation of the technology of *in vitro* clonal micropropagation of hazelnuts is promising. The use of this method contributes to the mass production of homogeneous, infection-free planting material of hazelnuts for laying plantations of parent plants. In the course of our research, we optimized the protocol of clonal micropropagation of three cultivars of hazelnuts. It was found that for the cultivation of the studied cultivars, the most balanced in mineral composition is the DKW medium supplemented with 3.5 mg/l 6-BAP, 1.0 mg/l GA and 0.3 mg/l IAA; modification of the NRM medium supplemented with 1.0 mg/l GA + 1.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l IBA effectively promotes rhizogenesis from explants; GA showed a synergistic effect together with NAA on the rooting of hazelnut microshoots, by the 4th week of cultivation, the number of shoots with roots reached 90–100%; in the conditions of a climate chamber using peat with sand substrate (50:50), the efficiency of adaptation to soil conditions was 92% for KAH-29 cultivar, 80% – for Zakataly cultivar, and 36% – for Khachmas cultivar.

Keywords: adaptation; clonal micropropagation; nutrient media; growth regulators; reproduction; rooting; hazelnuts; *in vitro*; *in vivo*