

Сергієнко Н. В.

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

## СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПАГОНОУТВОРЕННЯ *IN VITRO* У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CORYLUS* L.

У статті наведено дані щодо ефективності стерилізації і морфогенезу представників роду *Corylus* L. в культурі *in vitro* залежно від генотипу та співвідношення ауксинів і цитокінінів у живильних середовищах.

### Вступ

У природній флорі України рід *Corylus* L. представлено лише одним видом — *C. avellana* L. Це найпоширеніший вид ліщини, природний ареал котрого охоплює всю Європу, крім крайньої північної та частково степової її частин, а також Кавказ та Малу Азію [1]. У колекції видів *Corylus* Національного дендропарку «Софіївка» НАН України вивчається ряд сортів і форм *C. avellana*, а також інші види цього роду, а саме: *C. americana* Walter, *C. chinensis* Franch., *C. colurna* L., *C. cornuta* Marsh., *C. heterophylla* Fisch. ex Trautv., *Corylus colchica* Albov (*C. iberica* Witt. et Kom.-Nat.), *C. jacquemontii* Decne. (*C. lacera* Wall.), *C. mandshurica* Fisch. (Maxim.), *C. maxima* Mill., *C. pontica* C. Koch., *C. sieboldiana* Blume, *Corylus ferox* var. *tibetica* (Batalin) Franch. (*C. tibetica* Batalin.).

Популяції *C. avellana*, *C. maxima* і *C. pontica* (останній сучасні систематики [11] відносять до синонімів *C. avellana* var. *pontica* (K. Koch) H. J. P. Winkl.) культивуються як горіхоплідні рослини ще з античних часів. Саме з цих видів відібрано більшість сортів і форм з великими і різноманітної форми горіхами, відомими нині під назвою фундук. Північноамериканський вид *C. americana* введено в культуру значно пізніше, однак у сортовому різноманітті цього виду виявлено форми, які за розмірами та іншими господарчо-цінними ознаками схожі з давно окультуреними *C. avellana*, *C. maxima* та *C. pontica*. Багаторазові спонтанні й штучні схрещування між цими трьома видами, а також з *C. colurna*, *C. americana* та деякими іншими

представниками роду *Corylus* дали чимало сучасних сортів фундука. При цьому важко сказати, якою є частка спадковості кожного з названих видів у формуванні генотипу фундука [1, 7], тому на проведеній у 2007 році до 120-річчя зо дня народження академіка М. І. Вавилова в НБС ім. М. М. Гришка НАН України міжнародній науковій конференції «Інтродукція рослин на початку XXI століття: Досягнення і перспективи» було запропоновано всі культивовані сорти фундука об'єднати у збірний вид *C. domestica* Kos. et Opal. [1]. Такий підхід знайшов розуміння і на Другому світовому науковому конгресі «Проблеми ботанічних досліджень в умовах зміни клімату», що відбувся у 2008 році у Делфті (Нідерланди) [7], а генетична спорідненість *C. americana*, *C. avellana*, *C. maxima* та *C. yunnanensis* (Franch.) A. Camus підтверджується молекулярними біологами [6].

На підставі харчової і лікарської цінності представників роду *Corylus*, їх широкого використання у декоративному садівництві, а також необхідності вдосконалення способів вегетативного розмноження, за якого забезпечується збереження генетичної однорідності видів, сортів і форм, можна визнати актуальними дослідження можливостей технологій *in vitro*. Зважаючи на численні повідомлення стосовно переваг мікроклонального розмноження рослин в культурі *in vitro* [2–5, 8–10, 12], певні успіхи в роботі з представниками роду *Corylus* [2–4, 8, 9, 12], які однак наразі не гарантують стабільні результати, метою виконаних досліджень було збільшення коефіцієнта розмноження за збереження

генетичної ідентичності розмножуваних *in vitro* мікроклонів.

#### Матеріали та методи досліджень

У базові живильні середовища, приготовлені за прописами Драйвера і Куніюкі (DKW) [5] та Ллойда і Мак Коуна (WPM) [10] і модифіковані фітогормонами, вводили попередньо стерилізовані експланти представників роду *Corylus*, зокрема: ліщини китайської — *C. chinensis*, ліщини ведмежої — *C. colurna* та декоративної форми ліщини звичайної ‘М’ясочервоної’ — *C. avellana* ‘Fuscogubra’.

За експланти брали живці розміром близько 2–3 см завдовжки (з однією пазушною брунькою кожен). Для їх отримання з обраної маточної рослини у другій декаді квітня зрізали пагони 10–15 см завдовжки, діагностували на відсутність–наявність інфекції, стерилізували і нарізували експланти.

Стерилізацію і введення у живильні середовища виконували керуючись загальноприйнятими принципами та методами роботи з культурами рослинних тканин [2–5, 8, 9]. Зважаючи на те, що стерилізація стартових матеріалів є одним з

найвідповідальніших етапів мікроклонального розмноження, та враховуючи результати попередніх досліджень щодо підбору компонентів і режиму стерилізації [2] стартовий матеріал обробляли в розчинах гіпохлориду натрію (NaOCl), дихлориду ртуті (HgCl<sub>2</sub>) та нітрату срібла (AgNO<sub>3</sub>) в оптимальних концентраціях, перевіряючи експозиції обробки в межах від 3 до 10 х в. До стерилізатора додавали емульгатор «Твін 80». Стерилізацію і решту процедур *in vitro* виконували в обладнаних бактерицидними лампами спеціальних стерильних приміщеннях і ламінарних шафах з надлишковим тиском стерильного повітря. Стерилізовані експланти після видалення залишків стерилізатора розміщували у пробірки з живильним середовищем.

Базові середовища модифікували додаванням ауксинів (ІОК —  $\beta$ -індолілоцтова кислота, ІМК —  $\beta$ -індолілмасляна кислота, НОК —  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота) та цитокинінів (6-БАП — 6-бензиламінопурин) у різних концентраціях та співвідношеннях (табл. 1).

За джерело вуглецю використовували глюкозу у рекомендованих для *C. avellana* кількостях [12].

1. Вміст рістрегулюючих речовин у модифікованих живильних середовищах, мг/л

Живильне середовище	ІОК	ІМК	НОК	6-БАП
DKW 1	0,01	—	—	1,0
DKW 2	—	—	0,01	1,5
DKW 3	—	0,01	—	2,0
DKW 4	—	0,05	—	2,5
WPM 1	0,05	—	—	1,0
WPM 2	—	0,1	—	1,5
WPM 3	—	—	0,01	2,0
WPM 4	—	0,01	—	2,5

Кислотність середовища доводили до рН 5,7 і автоклавували за температури 120 °С упродовж 20 хв. під тиском 1,1 кг/см<sup>2</sup>.

#### Результати досліджень та їх обговорення

Всі вивчені стерилізатори забезпечили кращу стерилізацію за десятихвилинної експозиції обробки, зокрема отримано 65,56 % стерильних експлантів у варіанті з HgCl<sub>2</sub> (0,1 %), 89,75 — з NaOCl (5 %) і 92,03 — з AgNO<sub>3</sub> (1,0 %), що

було найвищим показником ефективності власне стерилізації (табл. 2).

Однак завдання стерилізації стартового матеріалу для мікроклонального розмноження не обмежується очищенням заготовленого з маточної рослини живця від зовнішньої інфекції, хоча це й надзвичайно важливо. Та ще більш важливо зберегти життєздатність стерилізованого живця. З цих позицій NaOCl (5 %) переважив

## 2. Ефективність стерилізації експлантів залежно від форми стерилізатора та експозиції

Стерилізатор і концентрація	Експозиція, хв	Отримано експлантів, %	
		стерильних	життєздатних
Гіпохлорид натрію (NaOCl), 5%	3	10,03	8,21
	5	26,23	23,34
	8	78,85	70,63
	10	89,75	38,48
Дихлорид ртуті (HgCl <sub>2</sub> ), 0,1%	3	9,36	5,47
	5	38,12	11,36
	8	46,56	25,78
	10	65,56	13,52
Нітрат срібла (AgNO <sub>3</sub> ), 1,0%	3	15,3	13,83
	5	35,55	28,39
	8	58,49	16,43
	10	92,03	29,62
НІР <sub>0,5</sub>		4,3	3,9

AgNO<sub>3</sub> (1,0 %) і HgCl<sub>2</sub> (0,1 %). За використання п'ятивідсоткового розчину NaOCl і восьмихвилинної експозиції обробки було отримано найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів, що в середньому досягнув 70,63 %.

З-поміж вивчених генотипів найбільшу кількість пагонів за декаду у середньому по середовищах сформували експланти *C. avellana* 'Fuscorubra'. Експланти *C. chinensis* поступились *C. avellana* 'Fuscorubra' за спроможністю до пагоноутворення на чотири, а *C. colurna* — на 16 відсотків.

Встановлено специфічність реагування різних генотипів на модифікування середовища (рис. 1). Так експланти *C. colurna* і *C. chinensis* найкраще росли на середовищі DKW 3, в якому баланс ауксинів і цитокінінів було зміщено з перевагою 6-БАП (цитокінін) проти ІМК (ауксин) у 200 разів. Така схожість реагування на баланс ауксинів і цитокінінів зазначених генотипів стає зрозумілою під кутом зору, встановленої молекулярними біологами [6] близькості видів *C. colurna* і *C. chinensis*. За цими ж свідченнями [6] до *C. chinensis* філогенетично досить близький *C. jacquemontii*, що дає підстави очікувати *in vitro* схожого реагування його експлантів на модифікації живильних середовищ згідно вавилонських закономірностей, які поширюються на генотипи роду *Corylus* [1].

Експланти *C. avellana* 'Fuscorubra' натомість краще росли на середовищі WPM 2, в якому вміст доданого 6-БАП перевищував ІМК у 15 разів. Зміщення ауксин-цитокінінового балансу на користь цитокінінів — це класичний засіб індуквання галузнення пагонів *in vitro*, однак у наших дослідах з експлантами *C. colurna*, *C. chinensis* і *C. avellana* 'Fuscorubra' для середовища DKW в середньому по генотипах було більш ефективним 200-разове (DKW 3) перевищення цитокінінів, а за 50- (DKW 4), 100- (DKW 1) та 150-разового (DKW 2) перевищення цитокінінів пагоноутворення було меншим.

У середовищі WPM експланти *C. colurna* краще галузились у варіанті з 200-разовим перевищенням цитокінінів (WPM3), натомість WPM 2 із 15-разовим перевищенням їх вмісту було ефективнішим для *C. chinensis* і *C. avellana* 'Fuscorubra'. 20-разове (WPM 1) було менш ефективним, а показники пагоноутворення в середовищі з 250-разовим перевищенням цитокінінів (WPM 4) були найнижчими для всіх, використаних у досліді видів.

### Висновки

Встановлено, що серед вивчених варіантів стерилізації стартового матеріалу представників роду *Corylus* як першого етапу перед введенням *in vitro* більш ефективним виявилось

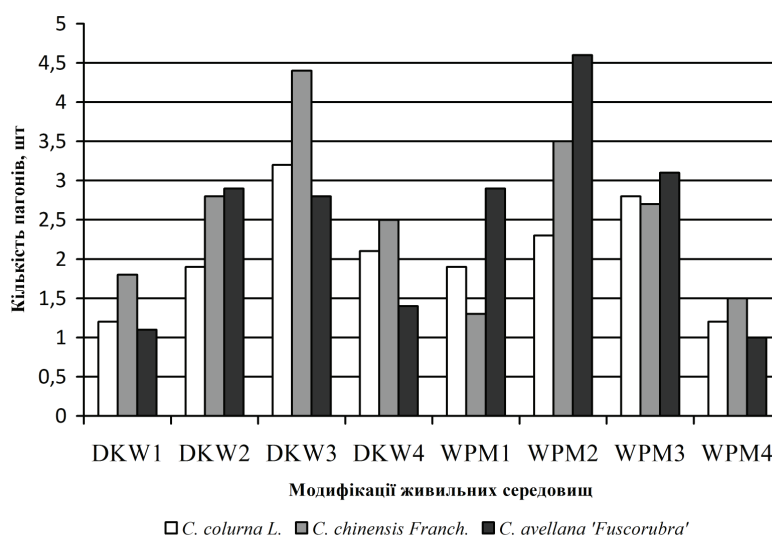


Рис. 1. Інтенсивність пагоноутворення у представників роду *Corylus* в культурі *in vitro* залежно генотипу рослин та модифікації живильних середовищ

використання п'ятивідсоткового розчину NaOCl за восьмихвилинної експозиції обробки, що забезпечило найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів.

Специфічність реагування різних генотипів на баланс ауксинів і цитокінінів підтверджує філогенетичну близькість видів *C. colurna* і *C. chinensis* та певну одлеглість *C. avellana*.

Для запровадження методів прискороного розмноження представників роду *Corylus* необхідно продовжити вивчення способів модифікування DKW, WPM та інших середовищ для подальшого вдосконалення пагоноутворення і виконання наступних етапів технології *in vitro* (вкорінення, адаптація *ex vitro*, дорощування тощо).

#### Перелік посилань

1. Косенко І. С. Динаміка роду *Corylus* L. як підтвердження закону М. І. Вавилова про гомологічні ряди у спадковій мінливості / І. С. Косенко, А. І. Опалко // Інтродукція рослин на початку XXI століття: Досягнення і перспективи (До 120-річчя з дня народження академіка М. І. Вавилова): Матер. міжнар. наук. конф. (2–4 жовтня 2007 р.). — К.: Фітосоціоцентр, 2007. — С. 70–74.
2. Косенко І. С. Перспективи мікроклонального розмноження представників роду *Corylus* L. / І. С. Косенко, А. І. Опалко // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр.

Укр. т-ва генет. і селекц. ім. М. І. Вавилова; Редкол.: ...Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 512–516.

3. Косенко І. С. Удосконалення способів мікроклонального розмноження *Corylus colurna* L. / І. С. Косенко, А. І. Опалко, М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини: Зб. наук. праць НДП «Софіївка» НАН України. — 2009. — Вип. 5. — С. 119–126.
4. Diaz-Sala C. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.) / C. Diaz-Sala, M. Rey, R. Rodriguez // Plant cell, tissue and organ culture. — 1990. — Vol. 23. — P. 151–157.
5. Driver J. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock / J. Driver, A. Kuniyuki // HortScience. — 1984. — Vol. 19. — P. 507–509.
6. Gökirmak T. Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers / Tufan Gökirmak, Shawn A. Mehlenbacher, Nahla V. Basil // Genetic Resources and Crop Evolution. — 2009. — Vol. 56, № 2. — P. 147–172.
7. Kosenko I. S. Disputable aspects of *Corylus* L. genus system / I. S. Kosenko, G. A. Tarasenko, Opalko A. I. // Inspiring solution in plant technology, horticultural research and sustainable conservation methods: 2nd World scientific congress: Challenges in botanical research and climate change (Netherlands, Delft, 29 June–4 July 2008). — Delft: Sicca Repro, 2008. — P. 37.

8. *Kosenko I. S.* Micropropagation of *Corylus colurna* L. / I. S. Kosenko, A. L. Boyko, A. I. Opalko, M. V. Nebykov, G. A. Tarasenko // *Acta Hort.* (ISHS). — 2009. — Vol. 845 (1). — P. 261–266.
9. *Kosenko I.* Vegetative propagation of *Corylus* L. through tissue culture / I. Kosenko, A. Opalko // *Monographs of botanical gardens: European botanic gardens together towards the implementation of plant conservation strategies.* — Warsaw: BG CBDC PAS, 2007. — Vol. 1. — P. 133–136.
10. *Lloyd G.* Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use tip culture / G. Lloyd, B. McCown // *Comb. Intl. Plant Prop. Soc.* — 1980. — Vol. 80. — P. 421–427.
11. *Bisby F., Roskov Y., Culham A., Orrell T., Nicolson D., Paglinawan L., Bailly N., Appeltans W., Kirk P., Bourgoin T., Baillargeon G., Ouvrard D.*, eds (2012). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 3rd February 2012.* Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col/](http://www.catalogueoflife.org/col/). Species 2000: Reading, UK.
12. *Yu X.* Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source / Xiaoling Yu, Barbara M. Reed // *Plant cell reports*, — 1993. — Vol. 12, № 5. — P. 256–259.

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОБЕГООБРАЗОВАНИЯ *IN VITRO* У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CORYLUS* L.

Сергиенко Н. В.  
 Национальный дендрологический парк «Софиевка»  
 НАН Украины

Исследовали эффективность стерилизации и морфогенеза представителей рода *Corylus* L. в культуре *in vitro* в зависимости от генотипа и соотношения ауксинов и цитокининов в питательных средах. Установлено, что среди изученных вариантов стерилизации стартового материала как первого этапа перед введением *in vitro* более эффективным оказалось использование пятипроцентного раствора NaOCl при восьмиминутной экспозиции обработки, что обеспечило высокий выход жизнеспособных стерильных эксплантов.

Специфичность реагирования различных генотипов на баланс ауксинов и цитокининов подтверждает филогенетическую близость видов *C. colurna* и *C. chinensis* и определенную отдаленность *C. avellana*.

Для внедрения методов ускоренного размножения представителей рода *Corylus* необходимо продолжить изучение способов модифицирования DKW, WPM и других питательных сред для дальнейшего совершенствования

побегообразования и выполнения последующих этапов технологии *in vitro* (укоренение, адаптация *ex vitro*, доращивание и т. д.).

## SPECIFICITY OF *IN VITRO* PROLIFERATION OF *CORYLUS* L. GENUS REPRESENTATIVES

Sergienko N. V.  
 National dendrological park “Sofiyivka” of the NAS of Ukraine

The effectiveness of sterilization and morphogenesis of the genus *Corylus* L. culture in of *in vitro*, depending on the genotype and the ratio of auxins and cytokinins in the media are investigated. Established that among the studied variants of sterilization as a starting material of the first stage before the introduction of *in vitro* more effective was the use of solution of NaOCl (5%) during 8 min. There are high percentage viability sterile explants.

Specificity of response of different genotypes on the balance of auxins and cytokinins are confirms phylogenetic closeness of species *C. colurna* and *C. chinensis* and some distance *C. avellana*.

To introduce the methods of accelerated reproduction of the genus *Corylus* must continue to studies ways of modifying DKW, WPM, and other nutrient media for further development of shoot and implementation of subsequent stage of technology *in vitro* (rooting, adaptation *ex vitro*, rearing, etc.).