

М.М. Аралбаева\*, Н.В. Михайленко, С.В. Кушнарченко

Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: berim.moldir@mail.ru

## Разработка способа укоренения побегов грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro*

Биотехнологии *in vitro* широко используются для сохранения биологического разнообразия и производства высококачественного посадочного материала. Основная проблема, затрудняющая разработку микроклонального размножения орехоплодных культур, связана с их низкой способностью к корнеобразованию в условиях *in vitro* и долгим периодом адаптации растений при переносе в почвенный субстрат. В качестве объектов исследования были использованы асептические побеги сортов и дикорастущих форм *Juglans regia* L. и *Corylus avellana* L., размноженные в культуре *in vitro*. Было проведено сравнение двух способов укоренения побегов лесного и грецкого орехов в культуре *in vitro*. Для грецкого ореха применение двухэтапного способа укоренения на агаризованной среде Мурасиге-Скуга с высокими концентрациями индолмасляной кислоты (10 мг/л) и сахарозы (60 г/л) (I способ) позволило в среднем получить 68,6 % укорененных растений. Второй способ укоренения при замене агара на вермикулит оказался наиболее эффективным для лесного ореха, при этом 91,3 % побегов *Corylus avellana* укоренялось в условиях *in vitro*. Адаптация растений лесного ореха к условиям теплицы проходила успешно, 91,8 % растений продолжили развитие. У грецкого ореха 28,6 % растений адаптировались к почвенному субстрату.

**Ключевые слова:** *Juglans regia*, *Corylus avellana*, грецкий орех, лесной орех, микроклональное размножение, укоренение *in vitro*, адаптация растений к тепличным условиям.

### Введение

Грецкий орех (*Juglans regia* L.) и лещина обыкновенная (лесной орех, фундук) (*Corylus avellana* L.) — наиболее ценные и популярные орехоплодные культуры. *Juglans regia* относится к семейству Ореховые (*Juglandaceae* A. Rich. ex Kunth), в Казахстане этот вид охраняется на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка, где имеется естественная популяция в Угамском очаге [1, 2]. *Corylus avellana* относится к семейству Березовые (*Betulaceae* S.F. Gray), в Казахстане зарегистрирована единственная популяция лесного ореха по левобережью реки Урал (Жайык), в связи с чем вид занесен в Красную книгу Казахстана [3], как очень редкий, находящийся под угрозой исчезновения.

В последнее десятилетие усилилась работа по развитию ореховодства в нашей стране, создана «Казахстанская ассоциация производителей и переработчиков орехов и ягод», увеличиваются площади промышленных ореховых садов на юге и юго-востоке республики. Для успешного выращивания орехоплодных культур необходимо использование качественного посадочного материала, в том числе высокопродуктивных сортов, приспособленных к почвенно-климатическим условиям региона. Традиционно орех грецкий размножают семенами или вегетативно путем окулировки и прививки. Преимущество семенного размножения заключается в том, что выращенные из семян дерева ореха грецкого более долговечны и устойчивы к болезням. Но при семенном размножении растения не всегда наследуют материнские признаки, позже вступают в фазу плодоношения. Размножение с помощью прививки — это очень трудоемкая процедура, при котором необходим контроль чистоты подвойного и привойного материала в отношении бактериальных и грибных патогенов. Очень трудно размножить орехи черенкованием из-за низкого процента укоренения черенков. В связи с этим актуальным является разработка технологии микроклонального размножения орехов для производства посадочного материала в течение круглого года. Технологии размножения *in vitro* грецкого и лесного орехов могут быть использованы для сохранения биологического разнообразия этих важных продовольственных культур, а также для получения высококачественного посадочного материала для фермерских и питомниководческих хозяйств страны.

Работа по микроклональному размножению грецкого и лесного орехов проводится в различных странах: в США [4–6], Иране [7–9], Испании [10], Японии [11], Украине [12, 13]. Недавно была опуб-

ликвана работа казахстанских ученых совместно с испанскими коллегами по микроклональному размножению грецкого ореха [14]. Основной проблемой, с которой сталкиваются исследователи, является низкий процент укоренения побегов орехоплодных культур в условиях *in vitro* и трудности, связанные с акклиматизацией растений при переносе в почвенный субстрат. Для повышения процента формирования корней во многих статьях предлагается двухэтапное укоренение побегов, при этом на первом этапе используются высокие концентрации ауксинов и источников углерода (сахароза), на втором — безгормональная среда и сниженная концентрация углеводов [7, 10, 12, 15]. Выявлено, что многие факторы влияют на эффективность укоренения. Так, снижение в 2–4 раза концентрации макроэлементов благоприятно сказывалось на развитии корней [12, 15]. Лучший эффект на ризогенез побегов грецкого ореха оказывала индолилмасляная кислота (ИМК) по сравнению с индолилуксусной кислотой или 1-нафтилуксусной кислотой [7, 10]. Значительный эффект оказывали также источники железа и углерода в питательной среде. Замена традиционно используемого хелата железа (FeEDTA), в котором железо находится в двухвалентном состоянии, на натриевую соль трехвалентного железа (FeEDDHA) приводила к гораздо более высокому проценту укоренения грецкого ореха [10]. Во многих работах по микроклональному размножению орехоплодных культур в качестве основного источника углерода обычно используется сахароза [10, 16, 17]. Сравнение действия трех углеводов: сахарозы, глюкозы и фруктозы в составе питательных сред показало, что фруктоза несколько повышала процент укоренения у некоторых генотипов грецкого ореха (63,3–95,0 %) по сравнению с сахарозой (48,5–95,2 %) и глюкозой (61,4–90,1 %), однако акклиматизация и выживание растений в теплице проходили быстро, если укоренение происходило на среде с глюкозой [10]. Одним из наиболее сложных этапов в производстве саженцев является перевод укорененных пробирочных растений в нестерильные условия. На адаптацию укорененных побегов в почвенном субстрате влияют многие физические факторы, такие как температура, влажность воздуха, интенсивность освещения и др. В качестве компонентов грунта используют готовые почвосмеси, чернозем, торф, перлит, вермикулит, песок, опилки и т.д. в различных сочетаниях и пропорциях [18].

Целью данного исследования являлась разработка способа укоренения побегов *Juglans regia* и *Corylus avellana* в условиях *in vitro*.

#### Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлись побеги грецкого и лесного орехов, размноженные в культуре *in vitro*. В данной работе были использованы четыре образца грецкого ореха (три образца, отобранные из фермерских хозяйств Алматинской области (Jug 012, Jug 013 и Jug 014), один образец (№ 16) — из дикорастущей популяции на территории Сайрам-Угамского государственного национального природного парка, а также три образца лесного ореха (два — из природной популяции, охраняемой в Государственном ботаническом заказнике «Дубрава», и один сорт итальянской селекции Тонда Романа (Tonda Romana). Плоды дикорастущих образцов были собраны во время научных экспедиций в 2018 году [19, 20]. Для получения побегов *in vitro* из дикорастущих образцов в качестве эксплантов были использованы изолированные зародышевые оси [21]; сорта вводились в культуру *in vitro* с использованием апексов побегов по методу, описанному ранее [22]. Побеги грецкого ореха размножали на среде Driver and Kuniyuki (DKW) [23] с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 30 г/л сахарозы, pH 5,7; лесного ореха — на среде DKW того же состава, но с увеличенной в 1,5 раза концентрацией микроэлементов. Побеги *in vitro* культивировали при температуре  $24 \pm 1$  °C, освещенности 40 мкмол·м<sup>-2</sup>·с, 16/8-часовом фотопериоде.

Для размноженных в культуре *in vitro* побегов, достигших 4–5 см высоты, были испытаны два способа их укоренения. Первый способ укоренения — на основе разработок Института клеточной биологии и генетической инженерии Украины [12] с небольшими модификациями. Он представляет собой двухэтапный метод укоренения побегов, на первом этапе которого стимулировали корнеобразование в темноте на жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) [24] (с полным составом макроэлементов или с уменьшенной вчетверо концентрацией макроэлементов), в присутствии высоких концентраций ауксина — ИМК (10 мг/л) и сахарозы (60 г/л). На втором этапе побеги переносили на безгормональную МС среду со стандартным минеральным составом и обычной концентрацией сахарозы (табл. 1).

Второй способ укоренения побегов *in vitro* проводили с использованием среды DKW. Он также представлял собой двухэтапный метод укоренения побегов, на первом этапе которого стимулировали корнеобразование в темноте на питательной среде DKW в присутствии высоких концентраций ИМК.

Второй этап заключался в удалении ауксина и замене агара на вермикулит [10] (табл. 1). Был использован вермикулит марки 150, с размером зерен от 0,6 до 5 мм (производство России), который добавляли по 30 г в каждую мадженту и заливали 60 мл жидкой среды DKW.

Т а б л и ц а 1

**Схема экспериментов по укоренению побегов грецкого и лесного орехов**

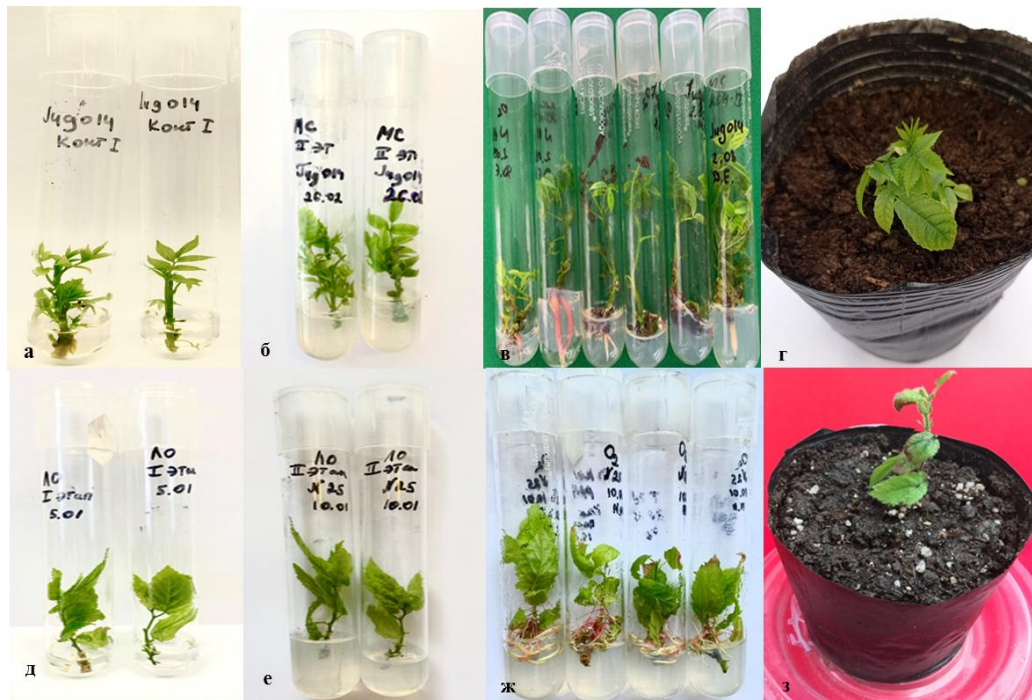
	1 этап (длительность этапа — 5 суток)	2 этап (длительность этапа — от 3 до 6 недель)
	Темнота, 25±2С°	24±1°С, освещенность 40 мкмол-м <sup>2</sup> с, 16/8 часовой фотопериод
I способ	Побеги культивировали на жидкой среде МС (с полным составом макроэлементов или с ¼ концентрацией макроэлементов); с 10 мг/л ИМК, 60 г/л сахарозы, рН 5,7	Побеги культивировали на среде МС (с полным минеральным составом), без добавления гормонов, с 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, рН 5,7
II способ	Побеги культивировали на среде DKW (с ½ концентрацией макроэлементов), с 10 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы, 5,5 г/л агара, рН 5,7	Побеги культивировали на жидкой среде DKW с вермикулитом, без добавления гормонов, с 30 г/л сахарозы, рН 5,7

Наблюдения за процессом корнеобразования проводили еженедельно. Укорененные побеги пересаживали в почвенный субстрат, состоявший из смеси почвы и перлита с соотношении (3:2), и переносили в пленочную теплицу в феврале–марте 2022 года. Температура в теплице варьировала от 15 до 20 °С, относительная влажность воздуха составляла 60–65 %. Первый месяц растения прикрывали пластиковыми колпаками для поддержания влаги. Через 1,5 месяца проводили подсчет адаптированных растений. В каждом варианте эксперимента использовали от 10 до 15 побегов каждого образца. Статистическую обработку проводили с использованием стандартных методов [25].

#### *Результаты и их обсуждение*

Результаты первого способа укоренения побегов грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro* представлены на рисунке 1 и в таблице 2 (I способ). Снижение концентрации макроэлементов в питательной среде МС в 4 раза благоприятно сказалось на последующем укоренении побегов грецкого ореха. Так, средний процент укоренения четырех образцов грецкого ореха составил 59,0 %, если на первом этапе их культивировали на среде со стандартной концентрацией макроэлементов, тогда как при уменьшенной концентрации макроэлементов количество укорененных побегов возросло до 68,6 % (табл. 2). Для лесного ореха такого влияния концентрации макроэлементов не было выявлено, высокие проценты наблюдали как при стандартной, так и при уменьшенной концентрации макроэлементов — 92,4 % и 87,5 %, соответственно (табл. 2). Отмечен гораздо более высокий процент укоренения образцов лесного ореха (76,9–100 %) по сравнению с грецким орехом (42,9–84,6 %). Следует отметить, что полученные нами результаты по укоренению лесного ореха значительно превышают процент укоренения, достигнутый ранее (72 %) [12]. Различия между орехоплодными культурами проявились не только в проценте укорененных побегов, но также и в скорости формирования корней в условиях *in vitro*. Образцы лесного ореха укоренились в течение 20–25 дней культивирования на безгормональной среде, тогда как для укоренения грецкого ореха потребовалось значительно больше времени — от 40 до 45 дней.

Результаты второго способа укоренения побегов грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro* представлены на рисунке 2 и в таблице 3 (II способ). Второй способ укоренения оказался гораздо более эффективным для лесного ореха по сравнению с грецким орехом. Процент укоренения образцов лесного ореха был достаточно высоким (86,7–93,85), тогда как только 6,1 % асептических побегов *Juglans regia* укоренились (табл. 3).



Побеги грецкого (а) и лесного (д) орехов на жидкой среде МС с ¼ концентрацией макроэлементов, 10 мг/л ИМК, 60 г/л сахарозы (1 этап укоренения); побеги грецкого (б) и лесного (е) орехов, пересаженные на безгормональную среду МС с 30 г/л сахарозы, 7 г агара (2 этап укоренения); корнеобразование грецкого (в) и лесного (ж) орехов на безгормональной среде МС с 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара; укорененные побеги грецкого (г) и лесного (з) орехов в почвенном субстрате

Рисунок 1. Этапы укоренения побегов грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro* (I способ укоренения)

Т а б л и ц а 2

**Влияние минерального состава среды на укоренение грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro* (I способ укоренения)**

Образец	МС, стандартная концентрация макроэлементов		МС, 1/4 концентрации макроэлементов	
	Кол-во побегов, шт.	%	Кол-во побегов, шт.	%
Грецкий орех				
Jug 012	13	53,8	12	75,0
Jug 013	13	84,6	13	84,6
Jug 014	14	42,9	15	53,3
№ 16	11	54,5	13	61,5
Ср.знач.±ст.откл.		59,0±17,9 <sup>б</sup>		68,6±13,9 <sup>б</sup>
Лесной орех				
№ 9	12	91,6	13	76,9
№ 25	12	100	12	100
Tonda Romana	14	85,7	14	85,7
Ср.знач.±ст.откл.		92,4±7,2 <sup>а</sup>		87,5±11,7 <sup>аб</sup>

Примечание. Данные, обозначенные различными буквами, достоверно отличаются при  $P \leq 0,05$ .



*a* — побеги лесного ореха на среде DKW с добавлением 10 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы, 5,5 г агара (1 этап укоренения); *б* — побеги лесного на жидкой среде DKW добавлением вермикулита (2 этап укоренения); *в* — побег лесного ореха с развитой корневой системой; *г* — укорененные побеги лесного ореха в почвенном субстрате

Рисунок 2. Этапы укоренения побегов лесного ореха в культуре *in vitro* (II способ)

Т а б л и ц а 3

**Укоренение грецкого и лесного орехов с использованием вермикулита (II способ)**

Образец	Кол-во побегов, шт.	%
Грецкий орех		
Jug 012	10	10
Jug 013	10	0
Jug 014	15	6,7
№ 16	13	7,7
Ср.знач. ± ст. откл.		6,1±4,3 <sup>б</sup>
Лесной орех		
№ 9	15	93,3
№ 25	16	93,8
Tonda Romana	15	86,7
Ср.знач. ± ст. откл.		91,3±0,04 <sup>а</sup>
<i>Примечание.</i> Данные, обозначенные различными буквами, достоверно отличаются при P<0,05.		

Таким образом, проведенные нами исследования позволили достичь высоких процентов укоренения грецкого и лесного орехов в культуре *in vitro*, сопоставимые с результатами предыдущих работ [7, 10, 12, 14].

Укорененные побеги грецкого и лесного орехов были перенесены в почвенный субстрат и помещены в пленочную теплицу. Проводили сравнение приживаемости растений в почве в зависимости от способа укоренения в культуре *in vitro*. Несмотря на то, что процент укоренения лесного ореха был высоким при использовании обоих способов укоренения, приживаемость растений в теплице значительно отличалась. Только 72,5 % побегов лесного ореха, укорененных в агаре (I способ), прижива-

лись в почвенном субстрате, тогда как 91,8 % побегов, укорененных в вермикулите (II способ), оставались жизнеспособными и нормально развивались в контейнерах. Этот факт объясняется, возможно, меньшим травмированием корней при использовании вермикулита, по сравнению с агаром, от остатков которого приходилось отмывать корни.

Адаптация растений грецкого ореха к тепличным условиям занимала гораздо более длительный период и была не такой эффективной, несмотря на высокий процент укоренения (42,9–84,6 %) и формирование мощных корней в культуре *in vitro*. Только 28,6 % пересаженных растений грецкого ореха прижились к тепличным условиям. Грецкий орех многими исследователями относится к трудноукореняемым культурам [9, 10]. Работа по повышению эффективности перевода растений *in vitro* грецкого ореха в почвенный субстрат будет продолжена. После адаптации посадочного материала к условиям теплицы саженцы подготовлены к переносу в полевые условия.

#### Заключение

Разработан способ укоренения побегов лесного и грецкого орехов в культуре *in vitro*. Для грецкого ореха использование двухэтапного способа укоренения на агаризованной среде МС с высокими концентрациями индолмасляной кислоты (10 мг/л) и сахарозы (60 г/л) (I способ) позволило достичь 68,6 % укоренения. Второй способ укоренения с применением вермикулита оказался наиболее эффективным для лесного ореха, 91,3 % побегов укоренялось в условиях *in vitro*. Адаптация растений лесного ореха к условиям теплицы проходила успешно, 91,8 % растений продолжили развитие. У грецкого ореха 28,6 % растений адаптировались к почвенному субстрату.

*Работа выполнена в рамках Гранта AP08855758 «Разработка эффективной технологии микроклонального размножения коммерчески ценных сортов грецкого ореха для производства высококачественного посадочного материала, адаптированного к условиям юго-востока Казахстана».*

#### Список литературы

- 1 Флора Казахстана / под ред. Н.В. Павлова. — Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1960. — Т. 3. — 459 с.
- 2 Джангалиев А.Д. Дикие плодовые растения Казахстана / А.Д. Джангалиев, Т.Н. Салова, Р.М. Туреханова. — Алматы: КазгосИНТИ, 2001. — 133 с.
- 3 Красная книга Казахстана. — Т.2: Растения. — 2-е изд. — Астана: ТОО «АртPrint XXI», 2014. — 452 с.
- 4 Leslie C. Micropropagation in Persian walnut (*Jugans regia* L.) / C. Leslie, G. McGranahan // In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, 18: High-tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin. — 1992. — P. 136–150. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_7)
- 5 Yu X. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus species*) / X. Yu, B.M. Reed // HortScience. — 1995. — P. 120–123.
- 6 Hand C.R. Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants / C.R. Hand, N. Wada, V. Stockwell, B.M. Reed // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. — 2016. — Vol. 52 (6). — P. 580–589. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9791-4>
- 7 Vahdati K. *In vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars / K. Vahdati, C. Leslie, Z. Zaman, G. McGranahan // HortScience. — 2004. — Vol. 39. — P. 324–327.
- 8 Vahdati K. Micropropagation of some dwarf and early mature walnut genotypes / K. Vahdati, R. Razaee, M. Mirmasoomi // Biotechnology. — 2009. — Vol. 8. — P. 171–175. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.171.175>
- 9 Gotea R. *In vitro* propagation of several walnut cultivars / R. Gotea, I. Gotea, R.E. Sestras, K. Vahdati // Horticulture. — 2012. — Vol. 69. — P. 167–171. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:8456>
- 10 Licea-Moreno R.J. Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA / R.J. Licea-Moreno, A. Contreras, A.V. Morales, I. Urban, M. Daquinta, L. Gomez // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2015. — Vol. 123. — P. 143–154. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0822-3>
- 11 Tetsumura T. Micropropagation of Shinano walnut (*Juglans regia* L.) / T. Tetsumura, K. Tsukuda, K. Kawase // J. Japan. Soc. Hort. Sci. — 2002. — Vol. 71 (5). — P. 661–663. <https://doi.org/10.2503/jjshs.71.661>
- 12 Патент № А 01 Н 4/00. SU 1792270 А3. Способ укоренения побегов орехоплодных, полученных *in vitro*. Оpubл. БИ. 1993. № 4. Н.М. Пивень, Г.Г. Мельничук, А.С. Фелалиев.
- 13 Деменко В.И. Проблемы и возможности микроклонального размножения садовых растений. Введение в культуру / В.И. Деменко // Изв. ТСХА. — 2005. — Вып. 2. — С. 48–58.
- 14 Yegizbayeva T.K. Unraveling factors affecting micropropagation of four Persian walnut varieties. / T.K. Yegizbayeva, S. Garcia-Garcia, T.V. Yausheva, M. Kairova, A.K. Apushev, S.N. Oleichenko, R.J. Licea-Moreno // Agronomy. — 2021. — Vol. 11. — P. 1417–1434. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071417>



- 15 McGranahan G.H. Tissue culture of *Juglans* / G.H. McGranahan, J.A. Driver, W. Tulecke // In: Bonga J.M., Durzan D.J. (eds). Cell and Tissue Culture in Forestry, Martinus Nijhoff, Boston. — 1987. — Vol. 3. — P. 261–271.
- 16 McGranahan G. *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars / G. McGranahan, C.A. Leslie, J.A. Driver // HortScience. — 1988. — Vol. 23. — P. 220.
- 17 Leslie C.A. Improved rooting methods for walnut (*Juglans*) microshoots/ C.A. Leslie, W.P. Hackett, G.H. McGranahan // ActaHortic. — 2009. — Vol. 861. — P. 365–372. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.50>
- 18 Клейн Р.М. Адаптация древесных растений *in vitro* в открытом грунте / Р.М. Клейн, Д.Т. Клейн // Методы исследования растений. — М., 2003. — С. 47–52.
- 19 Утегенова Г.А. Оценка состояния дикорастущей популяции ореха грецкого (*Juglans regia* L.) в Казахстане / Г.А. Утегенова, С.В. Кушнаренко, Қ.Р. Қалыбаев, Б. Шораұлы, Н.П. Огарь // Ізденістер, нәтижелер — Исследования, результаты. — 2019. — № 2. — С. 276–285.
- 20 Кушнаренко С.В. Современное состояние популяции лещины обыкновенной (*Corylus avellana* L.) в Казахстане / С.В. Кушнаренко, Н.В. Ромаданова, Н.П. Огарь, М.М. Аралбаева, М.А. Верзилов // Вестн. Караганд. ун-та. Сер. Биология. Медицина. География. — 2019. — № 2 (94). — С. 99–104.
- 21 Kushnarenko S. Current state and *in vitro* conservation of the only endangered population of *Corylus avellana* L. in Kazakhstan / S. Kushnarenko, N. Romadanova, M. Aralbaeva // Research on Crops. — 2020. — Vol. 21, No. 4. — P. 681–686. // <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2020.106>
- 22 Ромаданова Н.В. Микрклональное размножение некоторых сортов яблони: введение в культуру *in vitro* / Н.В. Ромаданова, С.В. Кушнаренко // Поиск. Сер. естеств. и техн. наук. — 2006. — № 1. — С. 54–58.
- 23 Driver J.A. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock / J.A. Driver, A.H. Kuniyuki // Hortic. Sci. — 1984. — Vol. 19. — P. 507–509.
- 24 Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plantarum. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- 25 Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

М.М. Аралбаева, Н.В. Михайленко, С.В. Кушнаренко

## Грек және орман жаңғақ өсімділерін *in vitro* культурасында тамырландыру әдісін әзірлеу

*In vitro* биотехнологияда биологиялық әртүрлілікті сақтау және жоғары сапалы екпе материалын алу үшін кеңінен қолданылады. Жаңғақ дақылдарының микрклональды көбеюінің дамуын тежейтін негізгі мәселе олардың *in vitro* жағдайында тамырлану қабілетінің төмендігі және топырақ субстратына көшкен кезде өсімдіктің ұзақ бейімделуі. Зерттеу нысаны ретінде *in vitro* культурасында көбейген *Juglans regia* L. және *Corylus avellana* L. сорттарының асептикалық өркендері және жабайы түрлері пайдаланылды. Грек пен орман жаңғақ өсімділерін *in vitro* культурасында тамырлаудың екі әдісі арасында салыстыру жүргізілді. Грек жаңғағы үшін индолилмай қышқылының (10 мг/л) және сахарозаның (60 г/л) жоғары концентрациясы бар Мурасиг-Скуга агаризацияланған ортада тамырлаудың екі сатылы әдісін қолдану (I әдіс) тамырланған өсімдіктердің орташа есеппен 68,6 % алуға мүмкіндік берді. Агардың орнына вермикулит қолдану екінші тамырландыру әдісі орман жаңғағы үшін ең тиімді болып шықты, *in vitro* жағдайында *Corylus avellana* өркендерінің 91,3 % тамырланды. Орман жаңғағының жылыжай жағдайына бейімделуі сәтті өтті, өсімдіктердің 91,8 % -ы дамуын жалғастырды. Грек жаңғағында өсімдіктердің 28,6 % топырақ субстратына бейімделген.

*Кілт сөздер:* *Juglans regia*, *Corylus avellana*, грек жаңғағы, орман жаңғағы, микрклональды көбейту, *in vitro* тамырландыру, өсімдіктердің жылыжай жағдайына бейімделуі.

М.М. Aralbayeva, N.V. Mikhailenko, S.V. Kushnarenko

## Development of rooting method for *Juglans regia* L. and *Corylus avellana* L. *in vitro* shoots

*In vitro* biotechnologies are widely used to preserve biodiversity and produce high quality planting material. The main problem that hinders the development of micropropagation for nut crops is their low ability to *in vitro* root formation and the long period of plant adaptation when transferred to a soil substrate. The aseptically propagated shoots of varieties and wild forms of *Juglans regia* L. and *Corylus avellana* L. *in vitro* micropropagated are used as plant material for this study. A comparison was made between two methods of *in vitro* rooting. For walnut, the use of a two-stage rooting method on Murashige-Skoog agar medium with high concentrations of indolyl 3 butyric acid (10 mg/l) and sucrose (60 g/l) (method I) made it possible to obtain an average of

68.6 % of rooted plants. The second rooting method, replacing agar with vermiculite, proved to be the most effective for hazelnut, with 91.3 % of *Corylus avellana* shoots rooting *in vitro*. The adaptation of hazelnut plants to the conditions of the greenhouse was successful, 91.8 % of the plants continued their development. In walnut, 28.6 % of plants adapted to the soil substrate.

*Keywords:* *Juglans regia*, *Corylus avellana*, walnut, hazelnut, micropropagation, *in vitro* rooting, plant adaptation to greenhouse conditions.

## References

- 1 Pavlov, N.V. (Ed.). (1960). *Flora Kazakhstan [Flora of Kazakhstan]*. Alma-Ata: Izdatelstvo Akademii nauk Kazakhskoi SSR, 3 [in Russian].
- 2 Dzhangaliev, A.D., Salova, T.N., & Turekhanova, R.M. (2001). *Dikie plodovye rasteniia Kazakhstan [Wild fruit plants of Kazakhstan]*. Almaty: Kazakhskii gosudarstvennyi institut nauchno-tehnicheskoi informatsii [in Russian].
- 3 (2014). *Krasnaia kniga Kazakhstan [Red Book of Kazakhstan] Vol. 2: Rasteniia — Plants (2nd ed.)*. Astana: ArtPrint XXI [in Russian].
- 4 Leslie, C., & McGranahan, G. (1992). Micropropagation in Persian walnut (*Juglans regia* L.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry, 18: High-tech and micropropagation II*. Springer-Verlag, Berlin, 136–150.
- 5 Yu, X., & Reed, B.M. (1995). A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* species). *HortScience*; 120–123.
- 6 Hand, C.R., Wada, N., Stockwell, V., & Reed, B.M. (2016). Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 52 (6); 580–589.
- 7 Vahdati, K., Leslie, C., Zaman, Z., & McGranahan, G. (2004). *In vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HortScience*, 39; 324–327.
- 8 Vahdati, K., Razaee, R., & Mirmasoomi, M. (2009). Micropropagation of some dwarf and early mature walnut genotypes. *Biotechnology*, 8; 171–175.
- 9 Gotea, R., Gotea, I., Sestras, R.E., & Vahdati, K. (2012). *In vitro* propagation of several walnut cultivars. *Horticulture*, 69; 167–171.
- 10 Licea-Moreno, R.J., Contreras, A., Morales, A.V., Urban, I., Daquinta, M., & Gomez, L. (2015). Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123; 143–154.
- 11 Tetsumura, T., Tsukuda, K., & Kawase, K. (2002). Micropropagation of Shinano walnut (*Juglans regia* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 71 (5); 661–663.
- 12 Piven, N.M., Melnichuk, G.G., & Felaliev, A.S. (1993). Patent № A 01 H 4/00. SU 1792270 A3. Sposob ukoreneniia pobegov orekhoplodnykh, poluchennykh *in vitro* [Method for rooting shoots of nut-bearing plants obtained *in vitro*]. Publ. 30.01.93 BI, 4 [in Russian].
- 13 Demenko, V.I. (2005). Problemy i vozmozhnosti mikroklonalnogo razmnozheniia sadovykh rastenii. Vvedenie v kulturu [Problems and possibilities of micropropagation of garden plants. Introduction to culture]. *Izvestiia Timiriazevskoi selskokhoziaistvennoi akademii — Proceedings of Timiryazev Agricultural Academy*, 2; 48–58 [in Russian].
- 14 Yegizbayeva, T.K., García-García, S., Yausheva, T.V., Kairova, M., Apushev, A.K., Oleichenko, S.N., & Licea-Moreno, R.J. (2021). Unraveling factors affecting micropropagation of four Persian walnut varieties. *Agronomy*, 11; 1417–1434.
- 15 McGranahan, G.H., Driver, J.A., & Tulecke, W. (1987). Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga J.M. & Durzan D.J. (eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Martinus Nijhoff, Boston, 3; 261–271.
- 16 McGranahan, G., Leslie, C.A., & Driver, J.A. (1998). *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. *HortScience*, 23, 220.
- 17 Leslie, C.A., Hackett, W.P., & McGranahan, G.H. (2009). Improved rooting methods for walnut (*Juglans*) microshoots. *Acta Hort.*, 861; 365–372.
- 18 Klein, R.M., & Klein, D.T. (2013). Adaptatsiia drevesnykh rastenii *in vitro* v otkrytom grunte [Adaptation of *in vitro* woody plants to the open field]. *Metody issledovaniia rastenii — Plant research methods*, 47–52 [in Russian].
- 19 Utegenova, G.A., Kushnarenko, S.V., Kalybaev, K.R., Shorayly, B., & Ogar, N.P. (2019). Otsenka sostoiianiia dikorastushchei populatsii orekha gretskogo (*Juglans regia* L.) v Kazakhstane [Assessment of the condition of wild walnut (*Juglans regia* L.) population in Kazakhstan]. *Izdenister, natizheler — Issledovaniia, rezultaty — Research, results*, 2; 276–285 [in Russian].
- 20 Kushnarenko, S.V., Romadanova, N.V., Ogar, N.P., Aralbaeva, M.M., & Verzilov, M.A. (2019). Sovremennoe sostoianie populatsii leshchiny obyknovnoi (*Corylus avellana* L.) v Kazakhstane [Current state of Hazel (*Corylus avellana* L.) population in Kazakhstan]. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Serii Biologiia. Meditsina. Geografiia — Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography series*, 2 (94), 99–104 [in Russian].
- 21 Kushnarenko, S., Romadanova, N., & Aralbaeva, M. (2020). Current state and *in vitro* conservation of the only endangered population of *Corylus avellana* L. in Kazakhstan. *Research on Crops*, 21(4); 681–686.
- 22 Romadanova, N.V., & Kushnarenko, S.V. (2006). Mikroklonalnoe razmnozhenie nekotorykh sortov yabloni: vvedenie v kulturu *in vitro* [Microclonal reproduction of some varieties of apple trees: introduction *in vitro* conditions]. *Poisk. Serii estestvennykh i tekhnicheskikh nauk — Research. Series of natural and technical sciences*, 1, 54–58 [in Russian].



23 Driver, J.A., & Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *Hortic. Sci.*, 19; 507–509.

24 Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15; 473–497.

25 Lakin, G.F. (1990). *Biometriia* [Biometry]. Moscow: Vysshaia shkola [in Russian].