

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 деревья 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 ± 1 °C, освещенности 40 мкмол·м⁻²·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

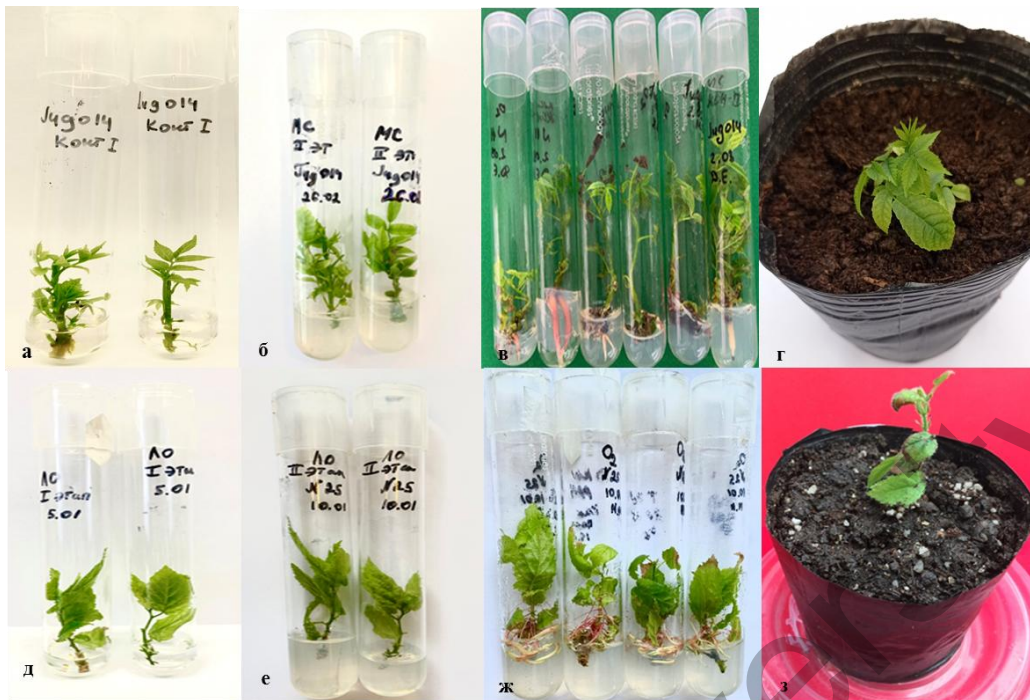
	1 этап (длительность этапа — 5 суток)	2 этап (длительность этапа — от 3 до 6 недель)
	Темнота, 25±2С°	24±1°С, освещенность 40 мкмол-м ² с, 16/8 часовой фотопериод
I способ	Побеги культивировали на жидкой среде МС (с полным составом макроэлементов или с ¼ концентрацией макроэлементов); с 10 мг/л ИМК, 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 (з) 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 ^б		68,6±13,9 ^б
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 ^а		87,5±11,7 ^{аб}

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 ^б
Лесной орех		
№ 9	15	93,3
№ 25	16	93,8
Tonda Romana	15	86,7
Ср.знач. ± ст. откл.		91,3±0,04 ^а
<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
- 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. Yaushева, 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. Кушнарченко, Қ.Р. Қалыбаев, Б. Шораұлы, Н.П. Огарь // Ізденістер, нәтижелер — Исследования, результаты. — 2019. — № 2. — С. 276–285.
- 20 Кушнарченко С.В. Современное состояние популяции лещины обыкновенной (*Corylus avellana* L.) в Казахстане / С.В. Кушнарченко, 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. Кушнарченко // 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 // Hort. 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. Кушнарченко

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., Garcia-Garcia, S., Yaushева, 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 populiatsii 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 populiatsii 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: Vysshiaia shkola [in Russian].

Букеетов университет