



Ю. С. Лysак

Український ордена "Знак пошани" науково-дослідний інститут лісового господарства і агролісомеліорації
ім. Г. М. Висоцького, м. Харків, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ КЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ФУНДУКА ШЛЯХОМ ЖИВЦЮВАННЯ В УМОВАХ *IN VITRO* ТА ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЇЇ ЕФЕКТИВНОСТІ

Досліджено процес клонального розмноження фундука сортів 'Велетень', 'Харків-4', 'Лозівський кулеподібний', 'Пірожок' шляхом паралельного стимулювання процесів адвентивного ризогенезу та гемогенезу в умовах *in vitro*. Як експлант було використано фрагменти живців. У ході виконання роботи було вивчено вплив середовища WPM (англ. *Woody Plant Medium*) із зменшеним на 75 % вмістом макро- та мікроелементів на морфогенетичний розвиток експлантів. Також досліджено ефективність додавання екзогенних регуляторів росту рослин у середовище культивування за показниками регенерації експлантів, зокрема здатності до адвентивного ризогенезу. Було порівняно вплив комбінацій різних типів ауксинів/цитокінінів на показники регенерації та оцінено їх стимулювальну дію на процес адвентивного ризогенезу. Отримано наступні результати: використання поживного середовища WPM із зменшеною концентрацією неорганічних сполук давало змогу отримати показники регенерації експлантів вищі за 90 %, найбільшу частку ризогенетично активних експлантів отримано при застосуванні комбінацій ауксину ІМК у концентраціях 1,0, 2,0 та 5,0 мг/л та цитокініну 6-БАП у концентраціях 0,1, 0,2 та 0,4 мг/л у поживному середовищі – 92,89, 96,24 та 89,95 %%, і, навпаки, додавання у поживне середовище індоліл-оцтової кислоти (ІОК) як ауксину та кінетину з групи цитокінінів знижувало показники регенерації. У процесі додаткового дослідження ризогенетичної здатності експлантів за якісним інтегрованим показником укорінення (ІПУ) було з'ясовано, що найвищим регенераційним потенціалом володіють експлантати сортів 'Велетень', 'Харків-4', які мали значення ІПУ дещо більші за 60 %.

Ключові слова: експлантати фундука; поживне середовище; морфогенетичний розвиток; адвентивний ризогенез; гемогенез; регенераційна здатність; апікальна меристема; утворення придаткових коренів; примордій; камбіальний шар.

Вступ / Introduction

Фундук (*Coryllus maxima* Mill.) є важливою промисловою культурою багатьох країн світу. Кожна з яких використовує для плантаційного розведення свій набір культиварів [15, 42, 44, 54]. Ще у 30-х роках минулого століття на Харківщині, на базі УкрНДІЛГА було розпочато роботи із селекції горіхоплідних. Найкращі з отриманих форм було вегетативно розмножено і введено до колекційних насаджень.

Внаслідок селекції, проведеної під керівництвом Ф. А. Павленка, було отримано велику кількість гібридів і форм фундука, з них 37 виділено як кандидати у сорти, а 12 – внесено до Державного реєстру сортів рослин України [40]. Збереження сортів і форм можливо тільки за умов наявності генетично однорідного селекційного матеріалу, тобто отримання рослин-клонів за допомогою різних способів вегетативного розмноження.

На сьогодні вся сучасна технологія сортового розведення фундука, а також організація плантацій промислового призначення заснована на трьох групах процесів отримання і вирощування клонів нащадків. Перша група – вегетативне розмноження у відкритих умовах: класичні методики відсадків, щеплення, вкорінення

живців [39]. Друга група – клонування та тривале культивування клонів рослин деревних і чагарникових видів на твердих субстратах із залученням методів гідро- та геопоніки, які мають на увазі регульовані умови вирощування, контроль живлення, вологості, температури та режиму освітлення. Але виконання усього циклу операцій із застосуванням таких систем штучного живлення потребує великих площ приміщень і витрат на електронне оснащення. Третя група – клональне розмноження фундука в умовах *in vitro*. До останньої належать методи мікроклонального розмноження (МКР) у асептичних умовах [23, 33, 36].

У роботі Лось та ін. (2021) зазначено, що одним із найбільш ефективних способів вегетативного розмноження фундука є розмноження відсадками, яке здійснюється на маточних відсадкових плантаціях, сформованих з найцінніших сортів [39]. Однак, у відкритих умовах оточуючого середовища процес клонального розмноження (КР) пов'язаний із певними ризиками і успіх процесу залежить від ступеню негативної дії зовнішніх факторів. Так, на маточних плантаціях на кількість отриманих вкорінених відсадків і здатність до подальшого їх виживання впливають умови зростання

Інформація про автора:

Лysак Юлія Станіславівна, мол. наук. співробітник, відділ селекції, генетики та біотехнології.

Email: tetyana.o.korotyeyeva@lpnu.ua; <https://orcid.org/0009-0003-6912-7763>

Цитування за ДСТУ: Лysак Ю. С. Особливості технології клонального розмноження фундука шляхом живцювання в умовах *in vitro* та шляхи підвищення її ефективності. Науковий вісник НЛТУ України. 2023, т. 33, № 6. С. 33–47.

Citation APA: Lysak, Yu. S. (2023). Some features of the technology of hazelnut clonal propagation by cuttings *in vitro* and ways to increase its efficiency. *Scientific Bulletin of UNFU*, 33(6), 33–47. <https://doi.org/10.36930/40330605>

(метеорологічні умови, склад ґрунтів, наявність чи відсутність штучного зрошення). Наприклад, у роботі Лось та ін. (2021), де наводиться опис процесу розмноження відсадками різних сортів фундука, зазначено, що у перший рік після закладання досліду з причини того, що кількість опадів протягом вегетаційного періоду була мінімальною, а штучне зрошення було відсутнє, коріння у пагонів не з'явилося, а утворилося тільки на наступний рік [39].

Третя група методів розмноження в умовах *in vitro* відрізняється від двох попередніх значно більшими витратами часу та ресурсів за рахунок проведення процедури введення експлантів до асептичної культури [6, 29, 36]. Але завдяки високому коефіцієнту розмноження та можливості здійснення процесу упродовж всього року, методи МКР можуть застосовуватись для швидкого розмноження селекційного матеріалу впродовж декількох місяців, тоді як при використанні інших методик це може зайняти до трьох років [16, 33]. Водночас, це найбільш надійний спосіб отримання генотипічно однорідного зі стабільним геномом матеріалу, який відповідає потребам селекції і меті збереження генофонду цінних сортів. Особливо це важливо для підтримки колекцій чистих ліній *ex* та *in situ* [44, 57].

Промислові технології мікророзмноження господарсько-цінних культур були запропоновані ще професором Р. Г. Бутенком у 60-х роках минулого століття [36]. Однак, зараз технології розмноження фундука в умовах *in vitro* знаходять своє використання здебільшого у селекційному процесі, для підтримання колекцій та розмноження окремих генотипів у невеликих масштабах. Для того, щоб методи МКР фундука широко використовувались для масового виробництва цінного селекційного матеріалу необхідно зробити їх конкурентоздатними. А це, водночас, потребує максимального спрощення та здешевлення усього процесу мікророзмноження.

Ліщина звичайна (*Corylus avellana*) та її сорти достатньо добре піддаються клональному розмноженню, але далеко не всі сорти фундука – культури, яка створена шляхом гібридизації, легко регенерують та відрізняються швидким вкоріненням [28, 29, 43]. Незважаючи на багаторічні досягнення та світовий досвід вегетативного розмноження фундука в умовах *in vitro*, ще і досі залишається не вирішеною ціла низка проблем.

Одні з них більш загального характеру, такі, що пов'язані із біологією самого об'єкту, наприклад, ускладнене утворення адвентивних коренів у живців ксиларних дводольних рослин, що мають вторинний камбіальний ріст, яке спостерігається при розмноженні зеленими живцями деревних і кущових форм [4, 5, 60]. Це характерно і для представників родини *Betulaceae*, завдяки особливостям анатомічної будови стебла та високому вмісту поліфенолів у корі [34, 52]. А інші проблеми виникають при здійсненні методик отримання донорського рослинного матеріалу, для введення його у культуру, виконанні процесів стерилізації, стимулюванні ризогенезу та підготовки рослин-регенерантів до перенесення з умов *in vitro* до відкритого середовища, і які є пов'язаними із індивідуальними особливостями, притаманними окремим сортам та гібридам фундука [3, 29, 32, 42, 55, 57].

Отримання матеріалу для розмноження належної якості від материнських рослин також є складним зав-

данням, оскільки фізіологічний стан рослин-донорів залежить від умов оточуючого середовища та сезону [10, 26]. Потребам технології живцювання *in vitro*, аналогічно, як і для інших технік вкорінення живців деревних рослин, можуть відповідати тільки зразки із камбіальною тканиною у активному стані (тобто, із активним радіальним ростом тканин стебла), отримані від рослин, які перебувають у фазі вегетації, що забезпечується відповідним гормональним статусом [1, 14].

Зважаючи на викладене вище, для оптимізації процесу клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* виникає потреба у: проведенні дослідів із стимулювання морфогенетичного розвитку експлантів з ціллю отримання високих показників регенерації та скорочення загального часу процесу культивування, що проходить від стадії первинного експланта до кореневласної рослини-регенеранта.

Об'єкт дослідження – процес клонального розмноження *Corylus maxima* Mill. в умовах *in vitro*.

Предмет дослідження – метод клонального розмноження *Corylus maxima* Mill., який містить такі стадії: отримання донорського матеріалу, введення асептичних живців у культуру *in vitro*, стимулювання адвентивного ризогенезу та гомогенезу шляхом використання різноманітних комбінацій ауксинів – цитокінінів, отримання та підготовка рослин-регенерантів до переносу в умови *ex vitro*.

Мета роботи – дослідити дію різних факторів на процес адвентивного ризогенезу зелених живців в умовах *in vitro*, оцінити загальну здатність до морфогенетичного розвитку стеблових живців різних сортів фундука у процесі клонального розмноження в умовах *in vitro*, зокрема здатність живців до утворення постійних придаткових коренів, підвищити ефективність клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* за рахунок оптимізації окремих стадій процесу.

Для досягнення зазначеної мети визначено такі основні завдання дослідження: порівняти стимулювальний ефект, який чинять поживні середовища, модифіковані різними комбінаціями фітогормонів, на ініціювання та розвиток морфогенезу, зокрема адвентивного ризогенезу, у експлантів різних сортів фундука; оцінити ступінь впливу на ризогенну здатність стеблових живців фундука в умовах *in vitro* спадкових факторів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Існує велика кількість технологій МКР, що базуються на методах непрямого органогенезу або морфогенезу, але ці методи, хоча і використовують частіше за інші, є довготривалим, складним та багатостадійним процесом [15, 24, 47]. У разі використання технік непрямого морфогенезу дуже складно регулювати напрямок окремих процесів, оскільки диференціація у морфологічні структури клітин неорганізованої калусної тканини складається із низки стадій, які іноді дуже складно розмежувати у часі, але кожна з яких індукується певною комбінацією регуляторів росту та потребує специфічного складу елементів живлення. Тому управління процесом ускладнене [8, 15, 31, 57].

Порівняно із розмноженням шляхом непрямого органогенезу, наприклад культурою тканин, методики прямого морфогенезу – процесу формування адвентивних (утворених *de novo*) органів (коренів і пагонів) на експлантах, перенесених в умови *in vitro*, без утворення калусу, тобто без проходження стадій дедиференціації і

подальшого утворення морфогенних меристем, містить меншу кількість пасажів, є більш контрольованими на окремих стадіях і більш передбачуваними за остаточним результатом [7, 36, 53].

Методи прямого морфогенезу відрізняються тим, що у процесі клонального розмноження використовують порівняно великі за розмірами експланти, з клітин яких відносно швидко, без попереднього утворення калусної тканини, формуються корені та пагони [23, 36].

У світовій практиці МКР деревних рослин шляхом прямого органогенезу особливо поширений метод культури пагонів. Як експланти використовують сегменти стебла із пазушними бруньками, в яких індукується пагоноутворення з ціллю отримання великої кількості бічних пагонів, які далі підлягають процедурі мікроживцювання і подальшого вкорінення [3, 44, 54, 56, 59, 63].

Одним із шляхів спрощення технік МКР є вилучення окремих стадій з процесу клонального розмноження за рахунок стимулювання двостороннього морфогенетичного розвитку експлантів, коли відбуваються одночасно процеси активації розвитку існуючих меристем пазушних бруньок на вихідному експланті, який вводиться до культури *in vitro*, та стимулювання адвентивного ризогенезу. Такі методи МКР, засновані на паралельній у часі індукції процесів гемо- та ризогенезу, здатні забезпечити швидкий морфогенез з отриманням рослини-регенеранта [29].

З одного боку, це спрощені, порівняно з іншим, схожим за типом експлантів методом клонального розмноження, який базується на індукції виникнення адвентивних бруньок на експланті, методи, оскільки виключають стадії виникнення адвентивних бруньок, їх росту та формування мікропагонів із подальшим їх розмноженням (мультиплікацією) шляхом мікроживцювання, переносом на нове поживне середовище для подальшого вкорінення. Але, з іншого боку, складність зазначених вище методів полягає у високому ступеню септичності вихідного, тобто первинного експланту, який піддається довгостроковому контакту із поживним середовищем. Також виникає складність у підборі збалансованого гормонального складу середовища культивування, за використання якого б відбувався швидкий та синхронний гемо- та ризогенез. Оскільки стимулювання одного із процесів морфогенетичного розвитку може призвести до зниження інтенсивності або повного припинення іншого. Потрібно синхронізувати темпи протікання та інтенсивність обох процесів для максимального прискорення органогенезу з ціллю швидкого переходу рослини-регенеранта з гетеротрофного на автотрофне живлення і подальшого переносу в умови закритого і далі відкритого ґрунту.

Для правильного управління процесом двостороннього морфогенетичного розвитку і спрямовування його на окремих стадіях у необхідний бік потрібне своєчасне додавання екзогенних фітогормонів і постійне регулювання їх концентрації у середовищі. Регенерація експлантів у процесі клонального розмноження шляхом живцювання заснована на адвентивному ризогенезі – процесі утворення постійних придаткових (кладогенних) коренів, у основі якого лежить перебудова тканин частини пагонової вісі у вісь кореня [4, 17, 18]. Саме анатомічна структура пагону впливає на утворення придаткових коренів у живців. У тій частині стебла, де закладено придатковий корень, локалізовано, відбу-

ваються перебудови у анатомічній структурі для створення особливих топографічних умов, що сприяють трансформації вторинної меристеми стебла (камбію) у первинну меристему кореня [41].

Появі первинної апікальної меристеми придаткового кореня передують наступні етапи: закладання ініціальних меристем придаткових коренів внаслідок діяльності камбію; топографічні перебудови тканин; паренхіматизація тканин стебла під час формування зони коренеутворення; гістологічна зміна серцевинних променів внаслідок збагачення їх тканин новими генераціями клітин та подальші зміни у зв'язку із гістогенезом апекса придаткового кореня. Внаслідок розтягнення клітин променевої паренхіми камбіальна зона утворює у проекції серцевинного променя та по його висоті камбіальні меристематичні бугорки, кожен із яких дає початок меристемі первинного бугорка придаткового кореня, яка розвивається у тіло первинного бугорка кореневого зачатка, з якого, внаслідок осьового розтягнення, утворюється примордій придаткового кореня. Далі відбувається утворення зрілої гістоструктури апекса [41, 60].

І до тепер залишаються остаточно нез'ясованими усі причини різної здатності до адвентивного ризогенезу зелених живців, а також появи морфологічно різних коренів у межах окремої придаткової кореневої системи.

Для дводольних у межах родин, як і у межах конкретної життєвої форми, укорінюваність є індивідуальною властивістю окремої рослини, прояв або пригнічення якої у великій мірі пов'язано з екологічними особливостями розвитку усієї рослинної спільноти. Навіть у межах одного виду виявляється різна здатність до формування придаткових коренів на живцях. І, хоча схильність до легкого, середнього або важкого укорінення не є спадковою, сортові рослини, що мають у своїй родословній схожі за здатністю до адвентивного утворення коренів види або сорти, часто подібні з ними за цією ознакою. Іноді носієм ознаки укорінюваності у більшій мірі є не життєва форма, а її екотип, хоча деревні форми росту, незалежно від таксономічної приналежності, відрізняються слабкою здатністю до формування кладогенних коренів, порівняно із ліанами та кущами [13, 14, 18, 34, 60].

Існує ряд робіт [4, 13, 17, 60], присвячених дослідженням причин різної ризогенетичної здатності живців або мікроживців деревних і кущових форм рослин, пов'язаних саме із їх анатомічною будовою, що є дуже корисним не тільки для підвищення ефективності технології клонального розмноження, а і для глибокого розуміння самого процесу адвентивного ризогенезу.

Результат вкорінення знаходиться у прямій залежності від фази росту рослин, оскільки утворення придаткових коренів відбувається внаслідок органогенної діяльності камбію. Під час формування постійних придаткових коренів ініціальний шар камбію у камбіальній зоні стебла бере участь у процесі коренеутворення, як гістогенна та органогенна меристема. Корінь здатен утворюватися тільки упродовж активного радіального приросту, оскільки саме на основі молодого приросту відбувається утворення камбіального меристематичного бугорка, з якого після 1-2 мітотичних поділів утворюється меристема первинного бугорка придаткового кореня. Першим етапом трансформації пагонової вісі у вісь кореня є радіальний ріст провідних тканин у області закладання кореня. Тобто зміни у зоні коренеутво-

рення пов'язані із реактивацією діяльності ініціального шару камбію, а саме, із підвищенням мітотичної активності для формування нової генерації молодих клітин радіального приросту. Далі камбіальна тканина, перебуваючи у активному стані, утворює ініціалі, які приймають участь в утворенні кореневого примордію. Від кількості ініціалей залежить швидкість та інтенсивність утворення корневих зачатків. Тривалість появи і розвитку коренів залежить від того, скільки поділів камбію впродовж радіального росту стебла є необхідним для перебудови тканин стебла у напрямку новоутворення кореня. Для таких видів, що швидко вкорінюються, – 3-5, а для видів, що повільно вкорінюються, – 12-20 поділів клітин камбіального шару [41, 43, 60].

Результатом спрямованої перебудови гістоструктури стебла є утворення бічного виросту провідних тканин, на верхівці якого відокремлюється меристема, здатна до перетворення у апекс придаткового кореня. Тобто на етапі, коли утворюється зріла гістоструктура апекса, формується первинна гістоструктура кореня, відбувається морфологічне відособлення зачатку кореня, який вже є придатковим коренем, але всередині тканин стебла живця. І чим інтенсивнішим є радіальний ріст стебла, тим швидше зачаток вийде на поверхню [34, 41].

Процеси формування первинного горбка придаткового кореня і подальшої його диференціації у апікальну меристему придаткового кореню знаходяться у тісній взаємодії з ростом клітин серцевинного променя. І саме від розтягнення клітин серцевинних променів стебла залежить позитивний чи негативний результат ризогенезу. Оскільки, завдяки розтягненню клітин серцевинного променя локально змінюється просторова орієнтація ізодіаметричних ініціалей камбію, змінюються напрями їх поділу, а це призводить не тільки до формування меристематичного бугорка придаткового кореня, але й до зумовленої деривації провідних тканин стебла і подальшого розвитку тканинного комплексу базипетального зв'язку придаткового кореню із стеблом [4, 17, 41, 60].

Матеріали та методи дослідження. Як вихідні експланти використовували стеблові мікроживці – ізольовані фрагменти пагонів у стадії їх активного росту, довжиною 20-30 мм, з однією пазушною брунькою у стані спокою, отриманих від рослин-донорів *C. Maxima* Mill. сортів 'Велетень', 'Харків-4', 'Лозівський кулеподібний', 'Пірожок'.

Усі досліді з клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* проводили за стандартних умов культивування, загальноприйнятих для біотехнологічних методів [23, 36].

Культивування експлантів на всіх стадіях процесу КР здійснювали на рідкому або напівтверділому агаризованому, зі зниженим вмістом агар-агару, модифікованому поживному середовищі WPM (англ. *Woody Plant Medium*) [45].

На кожній стадії процесу культивування використовували поживне середовище модифіковане одним або кількома із наступних регуляторів росту рослин, представлених у різних концентраціях і співвідношеннях: ІМК (β-індоліл-3-масляна кислота), ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота), НОК (α-нафтилоцтова кислота), 6-БАП (6-бензиламінопурин), кінетин (6-фурфориламінопурин).

Концентрації інших складових компонент середовища було збережено згідно зі стандартними прописами

[20, 45]. Стерилізацію рослинного матеріалу у процесі введення у культуру *in vitro* здійснювали шляхом триетапного поверхневого оброблення матеріалу з трикратним промиванням водою після кожного етапу. 1 етап: експозиція (1 хв) суміш розчинів 3 % перекису водню та 70° етилового спирту. 2 етап: експозиція (10 хв) 10 % гіпохлорит натрію (засіб "Білізна"). 3 етап: експозиція (5 або 10 хв) у 0,5 % водному розчині "Лізоформін-3000".

Морфогенетичний потенціал мікроживців оцінювали на 15 добу культивування шляхом підрахунку живців із ознаками ризо- та гомогенезу та без ознак, але морфологічні зміни стебла фіксували вже на 3 добу.

Окрім кількісного оцінювання додатково для проведення якісного оцінювання ризогенної здатності зелених живців фундука у процесі клонального розмноження в умовах *in vitro* було розраховано інтегрований показник укорінення (ІПУ) [30, 37]. Для цього проводили оцінювання якісних показників ризогенезу отриманих рослин-регенерантів на 25 добу культивування за оціночною шкалою, запропонованою О. В. Колесніченко (2008), яка використовується для оцінки ступеню вкорінення живців при розмноженні деревних рослин, і дещо адаптованою нами для процесу живцювання фундука в умовах *in vitro*:

- 0 балів – наявність калусної маси але коренеутворення відсутнє;
- 1 бал – наявність одного корінця 1-го порядку довжиною ≤ 2 см, корінці 2-го порядку нерозвинуті або малорозвинуті (слабкорозвинуті);
- 2 бали – наявність одного добре розвинутого корінця 1-го порядку довжиною ≥ 2 см, корінці 2-го порядку добре розвинені;
- 3 бали – наявність розвинутої кореневої системи із сформованим головним коренем, корінці 2-го і 3-го порядку добре розвинуті.

У методичних рекомендаціях з розмноження деревних декоративних рослин Ботанічного саду НУБІП України надана 6-бальна оціночна шкала якості укорінення за інтегрованим показником укорінення U (від 0 до 100 %), згідно з якою нами оцінювалася ризогенна здатність живців [30].

ІПУ розраховують за такою формулою:

$$U = \frac{P \cdot N_{\text{сеп}}}{3},$$

де: U – інтегрований показник укорінення, %; P – частка рослин регенерантів із корінням у варіанті досліду, %; $N_{\text{сеп}}$ – середній показник укорінення по варіанту, бал. Водночас, частку рослин регенерантів розраховують за такою формулою:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{j=1}^3 n_j,$$

де: n_1, n_2, n_3 – кількість рослин-регенерантів із корінням зі ступенем розвитку, якому відповідають оцінки 1, 2, 3 бали відповідно, шт.; n – загальна кількість живців у варіанті, шт.

Середній показник укорінення ($N_{\text{сеп}}$) вираховують за статистичною формулою для розрахунку середньої зваженої:

$$N_{\text{сеп}} = \frac{1}{n} \sum_{j=0}^3 n_j \cdot v_j,$$

де: n_0, n_1, n_2, n_3 – кількість рослин регенерантів без ознак ризогенезу у варіанті; v_0, v_1, v_2, v_3 – показники, які відповідають оцінкам 0, 1, 2, 3 бали відповідно.

Істотність різниць між дослідом та контролем визначено за допомогою критерію Стюдента. Середні арифметичні вірогідні при $P \geq 0,95$.

Результати дослідження та їх обговорення / Research results and their discussion

Методика та обґрунтування відбору сортів фундука для проведення досліджень. Успіх клонального розмноження визначається ризогенетичним потенціалом, який у великій мірі залежить від генотипу рослини. У нашій роботі для оцінювання здатності до ризогенезу експлантів різних сортів фундука, а також з метою порівняння ефективності процесу їх розмноження в умовах *in vitro*, було обрано сорти з найвищими – 'Харків-4', 'Велетень', 'Лозівський кулеподібний', та найнижчими (сорт 'Пірожок') показниками приживлюваності живців за використання методів вегетативного розмноження, зазначених у попередніх дослідках [28, 39].

Обираючи сорти 'Харків-4', 'Велетень', 'Лозівський кулеподібний', 'Пірожок' для проведення експерименту із клонального розмноження фундука в умовах *in vitro*, ми спиралися на дослідження 2017 року О. В. Колчанової (2018) з вегетативного розмноження сортів фундука шляхом літнього зеленого живцювання у червні у контрольованих умовах відкритого середовища та в умовах теплиці із автоматичним туманним зрошенням, які показали, що при вкоріненні зелених живців, незалежно від того, які було застосовано регулятори росту рослин, стимулятори коренеутворення та субстрати, найвищі показники укорінення та пагоноутворення серед усіх сортів, мали сорти 'Харків-4', 'Краснолистий', 'Олімпійський', 'Велетень', 'Боровський', 'Лозівський кулеподібний'. Напроти, низькі показники приживлюваності були характерні для сортів 'Пірожок', 'Доходний', 'Клиновидний' та 'Превосходный-2' [28].

У наданій роботі відображено результати виконання експериментів з клонального розмноження фундука в умовах *in vitro*, проведених у період з кінця 2017-2018 років на базі лабораторії селекції УкрНДІЛГА. Водночас, у 2018 році, співробітниками УкрНДІЛГА та ДП "Харківська ЛНДС" було закладено дослід з укорінення фундука вертикальними відсадками 12 найбільш перспективних сортів [39]. Для експериментів з КР фундука використовували матеріал, отриманий з тих самих сортів фундука, які використовували для дослідів з укорінення його вертикальними відсадками.

У процесі дослідження вивчали вплив екзогенних регуляторів росту та розвитку рослин у різних концентраціях і співвідношеннях на процеси морфогенезу фундука на різних стадіях розвитку експлантів.

Особливості виконання методики клонального розмноження. Для того, щоб скоротити час культивування і прискорити отримання кореневласної рослини-регенеранта, зменшити кількість пасажів із використанням поживних середовищ різного мінерального та гормонального складу і, в такий спосіб, максимально спростити процедуру МКР фундука, у ході експерименту нами використовувалася комбінація з двох методів – індукції у первинного експланта адвентивного ризогенезу в умовах *in vitro* та стимулювання сплячої бруньки експланта для пагоноутворення, із вилученням початкової стадії стимулювання пазушної бруньки у первинного експланта для утворення численних адвентивних пагонів за допомогою екзогенних цитокінінів і стадії ві-

докремлення і переносу пагонів на інше живильне середовище для подальшого їх вкорінення.

Культивування експлантів здійснювали на рідкому або напівтверділому середовищі WPM, оскільки відомо, що ущільнене середовище не сприяє активному росту та проліферації клітин. Отже, вміст агар-агару було знижено до 4 г/л. Також модифікації зазнав склад макро- та мікроелементів живлення. З ціллю зменшення осмотичності середовища та зниження концентрації азоту, оскільки відомо, що зниження концентрації неорганічного азоту у середовищі позитивно впливає на морфогенез фундука, вміст неорганічних сполук було зменшено на 75 % від їх базового складу, тобто використовували середовище з $\frac{1}{4}$ концентрацією мінеральних солей [19, 22, 44, 59].

Також, у процесі культивування вміст сахарози як джерело вуглецевого живлення у середовищі не був постійним, а коливався у межах від 0,03 до 0,1 моль/л, залежно від стадії процесу. Існують дані, що поступове зниження концентрації сахарози у процесі культивування, з 3 % до 1 % стимулює появу адвентивних бруньок та ріст пагонів [11, 36, 44].

У початковому поживному середовищі, на етапах адаптації ізолюваних первинних експлантів, активації розвитку меристем у пазушних бруньках та меристематичних камбіальних тканин, ініціації пагоноутворення та адвентивного ризогенезу, вміст сахарози складав 0,1 моль/л. На наступних етапах морфогенетичного розвитку використовували концентрації сахарози 0,08-0,05 моль/л. На остаточному етапі підготовки рослин-регенерантів до їх переносу з поживного середовища у відкриті умови теплиці – концентрацію 0,03 моль/л.

У ході виконання роботи особливу увагу було приділено процесу фрагментації матеріалу. Техніка виконання зрізів повинна спиратися на данні анатомічної будови стебла дводольних рослин та враховувати специфіку гістоморфологічної будови і майбутнього процесу трансформації тканин пагонової вісі у вісь кореня у представників роду *Corulus*.

Оскільки метод фрагментації матеріалу має великий вплив не тільки на подальше живлення експлантів, а і на подальший процес гістогенезу у бік новоутворення адвентивних коренів, необхідно у зоні відрізу мінімізувати пошкоджуючу дію на васкулярні елементи, особливо флоєми, оскільки ситовидні трубки стебла багатьох деревних рослин мають нахилені ситовидні пластинки, які прикриваючи трубки, утримують рідкий вміст, який витікає тільки при поперечному розрізі. Зазвичай флоємний транспорт зазнає більших пошкоджень ніж ксилемний, хоча є дуже важливим для живлення та розвитку майбутніх коренів. Але, окрім функції живлення, порушення флоєми має негативні наслідки для процесу адвентивного ризогенезу, оскільки камбій утворює первинні меристематичні бугорки у безпосередньої близькості до елементів флоєми та ксилеми, найчастіше у товщі клітин луб'яної паренхіми, яка утворює периваскулярні волокна навкруги ситовидних трубок. Також у процесі фрагментації матеріалу слід як можна менше порушувати структуру тканин серцевинної та променевої паренхіми та зв'язок між ними. Необхідно звести до мінімуму травмування серцевинних променів по всій їх протяжності, для того, щоб не переривався контакт між дистальними та латеральними ділянками променя. Оскільки існує пряма залежність но-

воутворення коренів від типу будови та цілісності серцевинних променів стебла, вздовж яких відбувається закладання ініціалей камбію.

Саме нахилений, під кутом 60°, зріз виключає пошкодження серцевини стебла, збільшує площу контакту судин із поживним середовищем та площу "оголеного" камбію, який при контакті із зовнішнім середовищем активується у зоні відрізу і діє, як раньова меристема, продукуючи у площину відрізу слабкодиференційовані паренхімні клітини. Із маси таких клітин, схожих на калусну тканину у багатьох випадках утворюються меристеми первинних бугорків придаткових коренів. У деяких випадках у деревних рослин примордії придаткових коренів залишаються всередині стебла пагону багато років, оскільки їх вихід на поверхню ускладнюється присутністю у вторинній корі та твердому лубі (луб'яних волокон) клітин склеренхіми. Особливо це спостерігається в більш стиглих пагонах. Але в зоні відрізу рихла паренхімна тканина виходить на зовнішню поверхню, чим полегшує ріст примордія в товщі тканин і його подальший розвиток у зачаток придаткового кореня.

Тканини фрагмента живця мають бути зрізані максимально рівно, без жодних розривів і здавлювань, тому виконання зрізу повинно здійснюватись дуже гострим лезом, спрямованим спочатку під прямим кутом до поверхні об'єкту, а далі плавно і м'яко прорізати тканини під кутом 60° доки потрібний фрагмент не відокремитиметься від живця.

Для перешкодження проникнення повітря у судини живця, зниження ступеня окислення фенольних сполук та запобігання дії гідролітичних ферментів, фрагментацію матеріалу та ізолювання експлантів здійснювали, занурюючи область відрізу у об'єм водного розчину антиоксидантів наступного складу: 0,01 % аскорбінової кислоти, 0,01 % лимонної кислоти, із подальшою експозицією експлантів впродовж 10 хв. Після чого ізолювані експланти перенесли на поживне середовище.

Оскільки додавання антиоксидантів у середовище культивування може негативно впливати на процеси морфогенезу і регенерації експлантів, гальмувати їх розвиток, було застосовано тільки поверхнєве оброблення тканин експлантів розчином антиоксидантів перед введенням у культуру [58].

У своїй роботі С. Silvestry et al. (2019) також використовували розчин аскорбінової (250 мг/л) та лимонної кислоти (250 мг/л) із додаванням ГАЗ та 0,1 % РРМ для замочування живців фундука впродовж 60 хв. у процесі введення експлантів у асептичну культуру [59].

Культивування на першій стадії – введення асептичних ізолюваних експлантів у культуру *in vitro* та їх адаптація, здійснювали на первинному рідкому поживному середовищі WPM з модифікованим мінеральним складом та вмістом сахарози 0,1 моль/л. Оскільки рідкі середовища мають перевагу у тому, що забезпечують більшу рухливість трофічних елементів, перші 5 діб культивування проводили на рідкому середовищі WPM без додавання екзогенних фітогормонів.

Для клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* головною була обрана комбінована технологія активації розвитку існуючих меристематичних тканин. Активування пазушних меристем проводилось за рахунок зняття апікального домінування, шляхом видалення верхівки пагону та культивування на безгормональному

модифікованому середовищі WPM. На початковій стадії не застосовувались екзогенні фітогормони, оскільки при видаленні апікальної частини пагону відбувається надходження до пазушних меристем ендогенних цитокінінів. Тільки у варіанті, де було застосовано короточасну поверхнєве оброблення зрізів 150 моль/л розчином ІМК перед введенням у культуру, без наступного додавання у поживне середовище, експланти зазнавали вплив екзогенних регуляторів росту.

Для запобігання додаткового утворення АФК, яке супроводжує окисдаційний стрес і внаслідок цього, перекисного окислення ліпідів і білків, а також фотоокислення карбонільних груп біополімерів, після переносу ізолюваних експлантів на рідке поживне середовище, першу добу культивування здійснювали у темряві [12].

На стадії активації розвитку меристем пазушних бруньок та камбіальних меристематичних тканин, тобто індукції морфогенезу, культивування проводили на агаризованому модифікованому середовищі WPM із додаванням 0,08 М сахарози та регуляторів росту із групи цитокінінів і ауксинів.

Культивування на стадіях формування та розвитку пазушних пагонів і активного адвентивного ризогенезу здійснювали на агаризованому модифікованому середовищі WPM із додаванням 0,05 М сахарози та регуляторів росту із групи цитокінінів і ауксинів.

Після отримання кореневласних рослин-регенерантів, на стадії підготовки до перенесення їх в умови *ex vitro* (стерильний ґрунт, контроль освітлення, вологості), культивування проводили на безгормональному агаризованому модифікованому середовищі WPM із додаванням 0,03 М сахарози, в умовах зниженої на 2-3 °С температури з періодичним витриманням рослин за температури 16 °С впродовж 3-х годин кожену добу.

Спостереження за морфологічними змінами у процесі органогенеза експлантів. У ході культивування експлантів фундука було відзначено поступові зміни, які відбувалися у морфології стебла живців. У області закладання коренів в базальній частині живця відбувається активний поділ паренхімних клітин, починається перебудова постійних тканин стебла живця, з'являється нова генерація клітин, внаслідок формується морфологічно відособлена зона коренеутворення.

Під час формування постійних придаткових коренів які мають камбій, камбіальна зона стебла та ініціальний шар камбію беруть участь у коренеутворювальному процесі як гістогенна та органогенна меристема.

Меристематична діяльність проліферуючих тканин камбіальної зони зумовлює приріст молоді тканини, яка представлена клітинами ініціального шару камбію, та молодими похідними деревини та лубу. Тобто на перших етапах вкорінення повинна відбуватися реактивація камбію базальної частини живця, що призводить до радіального розростання вторинних провідних тканин стебла. Одночасно із цим відбувається гістологічна перебудова зони коренеутворення. У живців зона коренеутворення формується за відносно короткий час, утворюючи новий приріст з клітин молоді деревини. Приріст тканин у зоні коренеутворення у період формування та ендогенного росту придаткових коренів представлений у більшості слабо диференційованою паренхімою [41].

Поява перших видимих змін відбувалася на 3-4 добу після перенесення живця на поживне середовище на вкорінення. Внаслідок підвищення паренхиматизації

базальної частини живця, від основної частини стебла відокремлювалась морфологічно відмінна зона коренеутворення. Спостерігалися зміна кольору із зеленого на жовтуватий або блідожовтий, втрата хлоренхімою зеленого забарвлення та істотне потовщення стебла, іноді із розтріскуванням епідермального шару та первинної кори, оскільки під час формування морфологічно видимої зони коренеутворення у процесі радіального росту стебла відбувається розтягнення покривних тканин, навіть із їх розтріскуванням. На нижньому зрізі утворювався калус.

Позначено, що в живців, які були фрагментами пагону, розташованими ближче до його базальної частини, живців із вторинними тканинами стебла більшого ступеню зрілості та в більших за лінійними розмірами та діаметром живців, зміни у морфології зони коренеутворення були більш вираженими.

У живців меншої довжини, в яких зона відокремлення від загального фрагменту пагона була розташована близько до вузлової зони із брунькою, та живців більшого діаметра, але із менш зрілими тканинами стебла, в деяких випадках було позначено інтенсивне накопичення слабкодиференційованої паренхімної тканини у місці нижнього зрізу внаслідок дії раньової меристеми. Також, у живців, що відрізнялись найменшою довжиною (отриманих із пагонів із вкороченими міждовузлями) було відзначено активне накопичення калусної тканини навколо області зрізу із сильним потовщенням стебла та трансформація зрілих тканин стебла, більш віддалених від базальної частини живця, у слабкодиференційовані тканини. Корені в таких експлантів утворювались набагато пізніше ніж у інших, або не утворювались зовсім.

Було позначено, що в деяких зразків вихід зачатка кореня на поверхню стебла відбувалася відносно швидко, без попередніх видимих змін у базальній частині живця. Але інші попередньо утворювали значне потовщення стебла із втратою зеленого кольору епідермального шару, та заміною його на жовто-зелений або сіруватий, і потребували більше часу для утворення зачатків придаткових коренів.

Відомо [13, 17], що важливим показником здатності рослини до живцювання є швидкість укорінення, оскільки показники укорінюваності і тривалості періоду укорінення взаємно обумовлені.

Повільне утворення придаткових коренів передбачає тривале перебування живців у середовищі культивування, що призводить до значних втрат тими пластичних речовин, ще до того, як почнеться утворення коренів. Внаслідок цього відбувається пригнічення регенерації живців внаслідок їх виснаження. У культурі *in vitro* уповільнене коренеутворення потребує більших концентрацій екзогенних фітогормонів і часу експозиції, що може призводити до відхилень від нормального морфогенетичного розвитку експлантів. Позначено, що ті сорти, які повільно утворюють придаткову кореневу систему, розвиваються також дуже повільно, слабо регенерують, потребують тривалого дорощування. Навпаки, сорти з легким та швидким вкоріненням відрізняються високими показниками приживлюваності живців при їх перенесенні в умови ґрунту.

Поява апексу придаткового кореня на поверхні, тобто вихід зачатку за межі тканин стебла відбувалася раніше, на 5-6 добу (тоді, як середній для усіх мікрожив-

ців час появи кореню на поверхні складав 8-9 діб), у живців отриманих із фрагментів пагону, розташованих ближче до його верхівки та в живців меншої довжини, із меншою відстанню між вузлом із брунькою та його нижньою частиною, зануреною у середовище культивування. Причому, у живців, отриманих із ділянок, ближчих до апікальної зони пагону і з менш зрілими вторинними тканинами та меншим діаметром, у більшості випадків появи коренів не передували видимі морфологічні зміни тканин зони коренеутворення.

Початковий етап коренеутворюючого процесу залежить від мітотичної активності камбію і тому має індивідуальні особливості: види, що легко та швидко вкорінюються, утворюють приріст 3-6 шарів клітин і далі виробляють корені, а рослини з тривалим періодом вкорінення до утворення коренів формують 35-40 шарів нових клітин [60].

На рис. 1, де представлені експланти, які відрізняються відносно швидким коренеутворенням, добре видно місце утворення та ступінь розвитку постійного придаткового кореня (12-та доба культивування).



Рис. 1. Експланти *Coryllus maxima* Mill. із розвиненими придатковими коренями, на етапі ініціації гемогенезу / Explants of *Coryllus maxima* Mill. with developed adventitious roots at the stage of initiation of hemogenesis

Відзначено, що місце появи адвентивного кореня на поверхні стебла живця у різних експлантів відрізняється. У більшості живців із вторинними тканинами більшого ступеню зрілості та розвиненим шаром первинної кори, корінь з'являвся з одного боку зони нижнього зрізу, у місці, де відбувалося утворення та накопичення паренхіми. А у живців із тканинами стебла, які піддалися вторинним змінам меншою мірою, корінь міг утворюватись у точці більш віддаленій від базальної частини живця, тобто вище вздовж стебла, на більшій відстані від нижньої зони відокремлення.

Можливо, це пояснюється тим, що всередині тканин стебла живця відбувається ендегенний ріст зачатків придаткових коренів, але їхній вихід на поверхню крізь тканини ускладнений в тих живцях, стебло яких вже має вторинну флоему, яка містить механічні елементи у вигляді прошарків склеренхіми, а також добре розвинену первинну кору, до складу якої входить пластинчаста коленхіма. Але у зоні відрізу та навкруги неї, де паренхімна тканина крізь розтріскування шарів епідерми та первинної кори виходить на поверхню, розрихлюючи склеренхімні волокна і цим, полегшуючи вихід кореня

на поверхню, апекс кореня у більш зрілих живців з'являється саме у цій області.

Оцінювання морфогенетичного розвитку експлантів. Для оцінювання ризогенетичної та загальної морфогенетичної здатності експлантів використовували кількісний показник регенерації – кількість експлантів, розвинених у рослину з утвореними *de novo* корінням та пагоном або живою брунькою, та інтегрований показник укорінення (ІПУ), що дає якісну характеристику процесу. Оцінювали кількість отриманих рослин-регенерантів при додаванні у середовище культивування різних концентрацій екзогенних регуляторів росту рослин у різному їх співвідношенні.

Оскільки головною метою дослідження з клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* було прискорене отримання рослин-регенерантів безпосередньо з первинних експлантів, уникаючи стадії утворення мік-

роривів і наступного їх вкорінення, здійснювали одночасне стимулювання двостороннього органогенезу. У процесі розмноження відмовились від послідовного, розділеного у часі морфогенетичного розвитку первинних і вторинних експлантів і в такий спосіб скоротили кількість пассажів.

У процесі дослідження проводили паралельне індукування у первинних експлантів процесів розвитку пазушної бруньки та адвентивного ризогенезу та вивчали ефективність використання комбінацій рослинних гормонів з груп ауксинів і цитокінінів.

Результати оцінювання ефективності поживного середовища WPM після його модифікації комбінаціями різних регуляторів росту рослин, представлених у різних концентраціях і співвідношеннях, наведено у табл. 1, 2, 3.

Табл. 1. Ефективність використання поживних середовищ з різним вмістом фітогормонів за показниками регенерації експлантів різних сортів фундука / Effectiveness of using nutrient media with different content of phytohormones according to indicators of explants regeneration of different hazelnut varieties

№ модифікації середовища WPM 1/4	Склад середовища WPM ¼ за фітогормонами					Назва сорту			
	ІМК	ІОК	НОК	БАП	Кінетин	В	Х-4	Лш	П
	Концентрація, мг/л					Показник регенерації, %			
1	— [#]	0,01	—	—	0,001	24,17	16,36	—	—
2	—	0,5	—	0,1	—	38,50	35,81	—	—
3	—	1,0	0,5	—	0,1	47,99	55,00	—	—
4	0,01	—	—	—	—	5,22	1,13	—	—
5	0,1	—	—	1,0	0,1	84,25	77,89	51,50	28,67
6	0,2	—	0,2	—	—	85,80	73,11	88,09	46,15
7	0,5	—	—	—	0,1	62,00	70,92	—	—
8	0,5	—	—	0,1	—	88,28	80,44	63,12	34,08
9	0,5	0,1	—	—	0,1	77,54	59,00	—	—
10	0,6	—	—	—	0,06	65,50	38,26	—	—
11	0,8	—	—	0,1	—	78,64	81,02	67,19	45,31
12	1,0	—	—	—	—	59,53	43,27	—	—
13	1,0	—	—	0,1	—	92,89	85,73	71,00	70,40
14	2,0	—	—	0,2	—	93,88	96,24	79,51	52,01
15	3,0	—	—	—	0,1	61,20	57,00	—	—
16	5,0	—	—	0,4	—	89,95	82,10	80,82	87,36

Примітка: В – 'Велетень'; Х-4 – 'Харків-4'; Лш – 'Лозівський кулеподібний'; П – 'Пірожок'. * Позначка "—" – у представленому експерименті показники регенерації не досліджувались для даних сортів. # Позначка "—" – відсутність фітогормона у поживному середовищі.

Табл. 2. Вплив регуляторів росту рослин (PPP), представлених у середовищі культивування в різних співвідношеннях концентрацій на середній показник регенерації експлантів фундука / Effect of plant growth regulators (PGR) presented in the cultivation medium in different concentration ratios on the average rate of hazelnut explants regeneration

№ варіанта	Склад середовища WPM ¼ за PPP					Відносні загальні концентрації ауксинів*/ цитокінінів у середовищі		Середній показник регенерації, %
	ІМК	ІОК	НОК	БАП	Кінетин			
	Концентрація, мкмоль/л					Аукс.	Циток.	
1	—	0,057	—	—	0,005	1	0,08	20,27
2	—	2,850	—	0,444	—	1	0,15	37,16
3	—	5,710	2,690	—	0,460	1	0,05	51,50
4	0,049	—	—	—	—	1	0	6,35
5	0,492	—	—	4,444	0,460	1	10	60,58
6	0,984	—	1,070	—	—	1	0	73,29
7	2,460	—	—	—	0,460	1	0,19	66,47
8	2,460	—	—	0,444	—	1	0,18	66,48
9	2,460	0,571	—	—	0,460	1	0,15	68,27
10	2,952	—	—	—	0,280	1	0,09	51,88
11	3,940	—	—	0,444	—	1	0,11	68,04
12	4,920	—	—	—	—	1	0	51,40
13	4,920	—	—	0,444	—	1	0,089	80,00
14	9,840	—	—	0,890	—	1	0,09	80,41
15	14,76	—	—	—	0,460	1	0,03	59,10
16	24,60	—	—	1,780	—	1	0,07	85,10

Примітка: * – загальна концентрація фітогормонів із групи ауксинів у середовищі прийнята за одиницю. Загальна концентрація цитокінінів наведена відносно одиниці. Позначка "—" – відсутність фітогормона у поживному середовищі.

Табл. 3. Результати кількісної та якісної оцінювання ризогенезу у різних сортів по варіантах, де досягнуто високих показників регенерації експлантів / Results of quantitative and qualitative assessment of rhizogenesis in different varieties according to variants where high rates of regeneration of explants were achieved

Склад* WPM 1/4	Назва сорту											
	Велетень			Харків-4			Лозівський кулеподібний			Пірожок		
	P, %	N, бал	U, %	P, %	N, бал	U, %	P, %	N, бал	U, %	P, %	N, бал	U, %
0,1ІМК+1БАП+0,1кін	84,3	1,78	50,0	77,9	1,38	35,8	51,5	0,82	14,1	28,7	0,39	3,7
0,2ІМК+0,2НОК	85,8	1,58	45,2	73,1	1,18	28,8	88,1	1,78	52,3	46,2	0,74	11,4
0,5ІМК+0,1БАП	88,3	1,76	51,8	80,4	1,51	40,5	63,1	1,04	21,9	34,1	0,45	5,1
0,5ІМК+0,1кін	62,0	1,04	21,5	70,9	1,41	33,3	—	—	—	—	—	—
0,5ІМК+0,1ІОК+0,1кін	77,5	1,58	40,8	59,0	0,96	18,9	—	—	—	—	—	—
0,6ІМК+0,06кін	65,5	1,23	26,9	38,3	0,59	7,5	—	—	—	—	—	—
0,8ІМК+0,1БАП	78,6	1,32	34,6	81,0	1,46	39,4	67,2	1,16	26,0	45,3	0,66	10,0
1ІМК+0,1БАП	92,9	1,98	61,3	85,7	1,76	50,3	71,0	1,41	33,4	70,4	1,53	35,9
2ІМК+0,2БАП	93,9	1,97	61,7	96,2	2,07	66,4	79,5	1,45	38,4	52,0	0,83	14,4
3ІМК+0,1кін	61,2	1,06	21,6	57,0	0,82	15,6	—	—	—	—	—	—
5ІМК+0,4БАП	90,0	1,80	54,0	82,1	1,58	43,2	80,8	1,61	43,4	87,4	1,88	54,8

Примітка: * – склад середовища WPM 1/4 за фітогормонами, концентрація яких виражена у мг/л; P – кількість укорінених клонів у варіанті, %; $N_{сер}$ – середній показник укорінення у варіанті, бал; U – інтегрований показник укорінення клонів (ІПУ), %.

За ефективністю стимулювання ризогенезу усі варіанти середовищ культивування з різним вмістом фітогормонів були поділені на 3 групи. Поділ здійснювали за відсотковими показниками регенерації, враховуючи кількість вкорінених рослин-регенерантів для двох сортів – 'Велетень', 'Харків-4'.

Група 1 з найнижчою ефективністю – загальна інтенсивність ризогенезу не перевищує 40 %:

ІОК (0,5 мг/л) + 6-БАП (0,1 мг/л);
ІОК (0,01 мг/л) + кінетин (0,001 мг/л);
ІМК (0,01 мг/л).

Група 2 з середньою ефективністю – отримано менше 70 % ризогенно-активних експлантів:

ІМК (1,0 мг/л);
ІОК (1,0 мг/л) + НОК (0,5 мг/л) + кінетин (0,1 мг/л);
ІМК (3,0 мг/л) + кінетин (0,1 мг/л);
ІМК (0,6 мг/л) + кінетин (0,06 мг/л);
ІМК (0,5 мг/л) + кінетин (0,1 мг/л);
ІМК (0,5 мг/л) + ІОК (0,1 мг/л) + кінетин (0,1 мг/л).

Група 3 з високою ефективністю – загальні показники регенерації перевищують 70 %:

ІМК (0,8 мг/л) + 6-БАП (0,1 мг/л);
ІМК (0,2 мг/л) + НОК (0,2 мг/л);
ІМК (2,0 мг/л) + 6-БАП (0,2 мг/л)*;
ІМК (5,0 мг/л) + 6-БАП (0,4 мг/л)*;
ІМК (1,0 мг/л) + 6-БАП (0,1 мг/л);
ІМК (0,5 мг/л) + 6-БАП (0,1 мг/л)*;
ІМК (0,1 мг/л) + 6-БАП (1 мг/л) + кінетин (0,1 мг/л).

Позначкою "*" позначено варіанти з найвищими показниками регенерації для сортів 'Велетень', 'Харків-4'.

Для групи ефективності №3 – варіантів середовища з найвищими показниками ризогенетичної активності експлантів, було проведено якісну оцінку коренеутворення рослин-регенерантів з визначенням якісного показника ІПУ (табл. 3).

Результати розрахунків ІПУ для окремих варіантів середовища, які продемонстрували найвищу ефективність представлені на рис. 2.

Як видно із табл. 1 та 2 високу ефективність у стимулюванні ризогенезу експлантів фундука виявляли комбінації з двох фітогормонів ІМК та 6-БАП. Найвищих показників регенерації експлантів було досягнуто за використанням середовищ в яких були присутні ІМК та 6-БАП у співвідношенні 10:1 – 85,7-96,2 %, причому концентрація ІМК в них повинна була становити не менше 1 мг/л. При зниженні вмісту ІМК ≤ 1 мг/л, показ-

ники ризогенезу знижувались до 78,6-88,3 %, але зниження було неістотне.

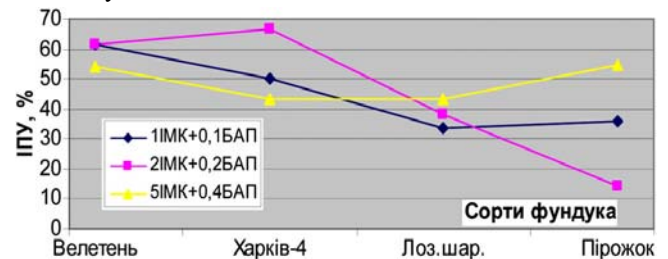


Рис. 2. ІПУ експлантів 4-х сортів фундука з групи варіантів із найвищою ефективністю поживного середовища / IIR of explants of 4 hazelnut varieties from the group of options with the highest efficiency of the nutrient medium

Додавання до суміші ІМК та 6-БАП інших регуляторів росту, таких як ІОК та кінетин не збільшувало показники регенерації, які коливались у межах 59-84,2 %.

Позитивні результати у деяких групах дало додавання у середовище з ІМК іншого ауксину – НОК. Це дало змогу отримати 73,1-85,8 % регенерантів. Але досліді із використанням комбінації НОК з ІОК та кінетином не демонстрували високу частку регенерації – 48-55 %.

Низька ефективність була відзначена для тих середовищ, де як екзогенних ауксинів і цитокинінів використовували тільки ІОК та кінетин – 16,4-24,2 %.

Також низькою ефективністю відрізнялись комбінації ІОК з 6-БАП, використання яких давало показники регенерації на рівні 35,8-38,5 %.

Поєднання у середовищі культивування ІМК з кінетином у різних концентраціях давало змогу отримати 38,3-70,9 % рослин-регенерантів.

Поживне середовище із додаванням ІМК у концентрації 0,01 мг/л виявилось найменш ефективним – 1,1-5,2 % експлантів з ознаками ризогенезу, але короточасне застосування поверхневого оброблення зони ініціації ризогенезу перед введенням експлантів до середовища культивування розчином ІМК у збільшеній до 100 мг/л концентрації, та за відсутності ауксинів у середовищі, збільшило показники ризогенезу до 97 % для сорту 'Велетень'.

Якщо розглядати окремо співвідношення концентрацій у комбінаціях регуляторів росту (табл. 2), видно що у групі № 3 варіантів з високою ефективністю середовища, співвідношення ауксини: цитокиніни приблиз-

но дорівнює 10:1, окрім середовища із комбінацією ІМК, 6-БАП та кінетин, із зворотнім співвідношенням концентрацій 1:10. Але, проаналізувавши дані щодо ефективності усіх варіантів комбінацій фітогормонів, можна зробити висновок, що співвідношення загальних концентрацій ауксинів/цитокінінів, за умови перевищення концентрацій ауксинів, не чинить такого впливу на морфогенетичну активність та інтенсивність регенерації експлантів, як загальний склад регуляторів росту рослин, що використовують, тобто присутності того чи іншого фітогормону у певній концентрації у середовищі. Наприклад, співвідношення ауксини/цитокініни дорівнює приблизно 10 до 1 у варіантах середовищ: ІОК + кінетин; ІОК + 6-БАП; ІМК + кінетин; ІМК + 6-БАП, але показники регенерації за використанням тієї чи іншої комбінації істотно різняться: 20,27, 37,16, 51,88, 80,41 % відповідно.

У деяких варіантах двосторонній морфогенез був ускладненим у зв'язку із пригнічуючою дією окремих регуляторів росту у певних концентраціях. Так, при застосуванні тільки ауксинів і їх комбінацій спостерігалось пригнічення розвитку бруньки. Використання комбінації ІМК + НОК у середовищі, а також поверхневого оброблення ІМК гальмувало утворення пагону. Також пригнічення розвитку бруньки мало місце при використанні наступних комбінацій: ІОК + НОК + кінетин; ІМК + ІОК + кінетин; ІМК + кінетин. За використанням 6-БАП замість кінетину у сумішах, пригнічення не спостерігалось.

У варіантах із співвідношеннями фітогормонів у середовищі: ІОК + кінетин; ІМК + НОК; ІМК (0,6 мг/л) + кінетин (0,06 мг/л), в більшості експлантів спостерігалась дедиференціація тканин з утворенням калусу або накопичення калусної маси у зонах активного поділу клітин.

В ході проведення дослідження інтегрований показник укорінення (U) вищий за 60 %, що за 6-бальною шкалою оцінювання ризогенної здатності стеблових живців відповідає 4 балам (61-80 %) – "живці укорінюються добре", вдалося отримати тільки за використанням поживного середовища із додаванням ІМК (2 мг/л) та 6-БАП (0,2 мг/л) для експлантів сорту 'Харків-4' – 66,4 %, та за використанням середовищ із комбінаціями ІМК (1 мг/л) + 6-БАП (0,1 мг/л) та ІМК (2 мг/л) + 6-БАП (0,2 мг/л) – 61,3 та 61,7 % відповідно, для сорту 'Велетень' [46].

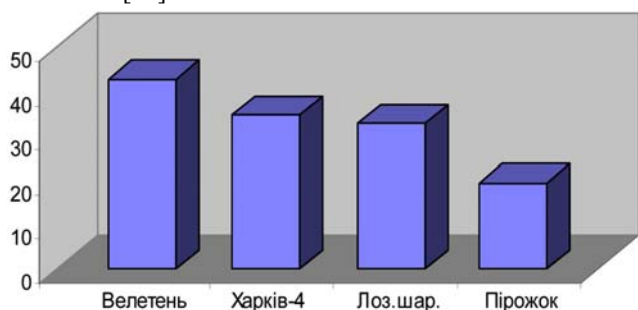


Рис. 3. Середній за усіма варіантами поживного середовища інтегрований показник укорінення (U , %) для кожного сорту / Average integrated rooting index (U , %) of each variety for all variants of the nutrient medium

Діаграма демонструє якісну оцінку регенераційної здатності експлантів фундука різних сортів за інтегрованим показником укорінення.

Важко встановити чітку закономірність залежно регенераційного потенціалу від використання екзогенних регуляторів росту та генотипу рослини в процесі розмноження в умовах *in vitro*, але у 5 варіантах із 7, де здатність до регенерації експлантів досліджувалась одразу у всіх 4-х сортів, відсоток регенерації був достовірно нижчий у сортів 'Лозівський кулеподібний' та 'Пірожок', порівняно із сортами 'Велетень' та 'Харків-4'.

Відповідь кожного із сортів на присутність у середовищі різних регуляторів росту рослин не є однаковою за інтенсивністю, хоча загальна картина в середині кожного варіанту зберігається для всіх сортів, як і тенденція розвитку експлантів.

У процесі культивування найслабкішу морфогенетичну активність демонстрував сорт 'Пірожок', в якого відсоток регенерації не перевищували 87,4 %. Тільки у двох варіантах застосування комбінацій ІМК та 6-БАП показники ризогенезу були вищими за 70 %.

Найбільшу кількість рослин-регенерантів і найвищі показники ризогенезу отримано в процесі клонального розмноження сортів 'Велетень' та 'Харків-4' – 93,9 % та 96,2 % відповідно – із застосуванням у поживних середовищах комбінації ІМК та 6-БАП.

Розрахунки середнього для кожного сорту інтегрованого показника укорінення (рис. 3) дали змогу отримати наступну картину залежності ризогенетичної здатності експлантів від генотипу: найвищий Усер отримано для сорту 'Велетень' – 42,67 %, що відповідає 3 балам за шкалою "успішності укорінення стеблових живців", 'Харків-4' – 34,52 % (2 бали), 'Лозівський кулеподібний' – 32,79 % (2 бали), 'Пірожок' – 19,33 % (1 бал). Для сортів 'Лозівський кулеподібний' та 'Пірожок' ні в одному з варіантів середовища не було досягнуто показників U , які відповідають 4 балам.

Можна припустити, що недостатня відповідь експлантів таких сортів, як 'Лозівський кулеподібний' та 'Пірожок' на присутність у середовищі регуляторів росту – ауксинів, цитокінінів, у тих концентраціях, які індукують морфогенез у сортів 'Велетень' та 'Харків-4', пов'язана із генетичними особливостями меристематичних тканин, тобто будовою рецепторного апарату їх клітин. Ймовірно експланти таких сортів у процесі клонування потребують інших концентрацій фітогормонів, або заміни одних аналогів на інші.

Слабку відповідь на застосування екзогенних регуляторів росту рослин можливо зумовлює генетична особливість деяких сортів, яка виявляється у різній чутливості клітин до ауксинів і цитокінінів, причиною якої є специфіка будови, стан та кількість рецепторів та, особливо, транспортерів активних молекул. Для ауксинів це три родини білків: транспортери ауксинів у клітини – AUX1 (AUXIN-INSENSITIVE1 LIKE AUX1), система переносників PIN (PIN-FORMED) для регуляції потоків ауксинів, ABCB (В підродина ABC транспортерів), також переносники ауксинів з родини PGP-білків – аніонних транспортерів [38, 61, 64].

Динамічний процес перерозподілу ауксинів відіграє важливу роль у морфогенетичному розвитку рослини. Саме білки транспортери виконують цей перерозподіл. Їх активність визначає направленість потоку ауксинів і сприяє утворенню у тканинах локальних максимумів концентрацій ауксинів, необхідних для ініціації розвитку окремих органів і різноспрямованого морфогенезу [2, 51, 62].

Рецепторами ауксинів є: білок TIR1, що входить у склад убіквітин-лігазного комплексу SCF, трансфактор ARF ауксинової відповіді, рецептор швидкої відповіді ABP1 – ауксин зв'язуючий трансмембранний білок 1 відповіді ARR [9, 35, 51, 62].

Також, на процеси ризогенезу можуть чинити вплив стресові гормони, особливо ті, що є антагоністами ауксинів. Абсцизова кислота, етилен, жасмонати, саліцилати, брассиностероїди – є антистресовими фітогормонами, які починають діяти при підвищенні рівня стресових білків у відповідь на абіотичні та біотичні чинники. Вони підвищують стійкість рослини до стресу, але можуть гальмувати ріст та поділ клітин [21, 25, 50]. Гібереліни також впливають на ризогенез, оскільки є антагоністами ауксинів і гальмують ріст кореня. І хоча, вони не є антистресовими гормонами, але, оскільки їх синтез проходить у листі дорослих рослин, при швидкій дефоліації і істотній втраті листової маси у рослини різко падає рівень гіберелінів у тканинах, що є сигналом для системи захисту від стресу [25].

Різниця вмісту стресових гормонів у тканинах рослин, які перебувають у стані стресу або потерпають від несприятливих умов, є реакцією, рівень прояву якої є різним у різних видів і культиварів. Відомо, що відповідь на дію стресових факторів, яка виявляється у збільшенні вмісту стресових білків і далі гормонів стресу більш активна у стійких до стресу рослин [21]. Генетичні особливості сорту зумовлюють стійкість до стресу, яка залежить від активності процесів синтезу стресових гормонів у відповідь на дію чинників, і яка визначає загальну стійкість до несприятливих умов оточуючого середовища. Навіть, якщо рослини-донори усіх культиварів, що досліджуються, перебувають у однакових, сприятливих для них умовах середовища, виділені з них експланти володіють різним ризогенним потенціалом, оскільки мають різну норму реакції генотипу. Більш широкою нормою володіють генотипи тих культиварів, які здатні легше пристосовуватись до змін або негативного впливу умов середовища.

Можливо, що ті генотипи, відповідь яких на вплив факторів оточуючого середовища більш сильна, мають і більш інтенсивний прояв реакції на присутність екзогенних регуляторів росту у поживному середовищі, а також відрізняються більш швидкою та інтенсивною регенерацією. Про це можуть свідчити дані, отримані у процесі вегетативного розмноження сортів Велетень та Харків-4 в умовах відкритого середовища із контрольованими та неконтрольованими умовами зростання, та в умовах закритого середовища із контролем всіх умов культивування [28, 39].

Загалом існує багато причин різної вкорінюваності зелених живців фундука різних генотипів в умовах *in vitro*, окрім факторів, які належать до гормональної регуляції та індукції ризогенезу. Це чинники, які, стосуються гістологічної будови та стану біооб'єкту, що вводиться до культури *in vitro*.

Основні причини, які впливають на процес адвентивного ризогенезу та визначають результати вкорінення і ефективність усього процесу клонування це: інтенсивність радіального приросту, тобто сезонна активність камбіального шару; стан тканин стебла та ступінь їх зрілості, особливо важливим є стан елементів провідної системи, оскільки розвитку кореня передуює зміна у гістологічній структурі саме провідних і паренхімних тка-

нин у зоні коренеутворення; різниця у анатомічній будові стебла живця, головним чинником є гістоструктура серцевинних променів.

Відомо [41], що головною умовою реалізації адвентивного ризогенезу є спрямовані зміни цитоморфологічного комплексу тканин у зоні коренеутворення у процесі їх інтенсивного радіального приросту. Тому перебудови зрілих тканин живця потребують стану активного росту, коли у ході процесів поділу і розтягнення клітин формуються первинні апікальні меристеми кореня. Процес коренеутворення починається зі змін гістоструктури провідних і паренхімних тканин: зменшення розмірів одноклітинних васкулярних елементів, посилення розвитку осьової та променевої паренхіми зі збільшенням розміру їх клітин. Далі повинні утворитися особливі топографічні умови, які залежать від ступеню паренхиматизації тканин стебла, а головне, від будови серцевинних променів стебла та здатності до розтягнення клітин серцевинних променів у камбіальній зоні. У процесі радіального приросту відбувається збільшення кількості шарів, ріст та розтягнення лежачих клітин серцевинного променя, які прилягають до ініціального шару камбію та взаємодіють із ним. В генерації клітин серцевинного променя утворюються клітини, завдяки розтягненню яких локально змінюється просторова орієнтація ініціалей камбію, що призводить до формування меристематичного бугорка і далі примордію придаткового кореня.

Позначено, що у рослин із палісадними та нерегулярними гетерогенними променями, які складаються із стоячих, лежачих і квадратних клітин, утворення первинної меристеми відбувається повільно, або не відбувається зовсім. Але у видів із гомогенною будовою променів, які складаються тільки із лежачих клітин, меристеми закладаються швидко, одночасно і у великій кількості. Отже, особливості росту, форми та орієнтації клітин серцевинного променя визначають здатність до формування стеблом придаткових коренів. В такий спосіб розвиток променевої паренхіми та її клітинний склад відіграють вирішальну роль у новоутворенні первинних меристем, що дають початок апікальним меристемам придаткових коренів дводольних рослин [4, 60].

Оскільки реалізація процесу адвентивного ризогенезу може залежати від незначних змін у гістоструктурі, саме визначення залежності здатності експлантів до ризогенезу в умовах *in vitro* від гістоструктури серцевинних променів, дає можливість пошуку нових технологій попередньої підготовки маточних рослин до живцювання та методів селекційному відбору рослин за критерієм здатності до живцювання, які мають необхідну впродовж камбіального росту гістоструктуру стебла. Для підвищення ефективності технологій клонального розмноження фундука необхідні подальші дослідження у напрямку вивчення залежності ризогенетичного потенціалу живців від анатомічної будови зони коренеутворення [4, 41].

Ступінь зрілості тканин стебла, тобто настання часу заміни первинних елементів на вторинні теж варто враховувати при живцюванні. У деревних дводольних рослин у процесі онтогенезу тканин стебла первинна структура доволі швидко порушується внаслідок вторинних змін. Особливо це стосується швидкозростаючих і скоростиглих сортів, в яких утворення вторинних структур стебла внаслідок діяльності камбію відбувається набагато раніше.

Первинна кора, окрім ендодерми та паренхіми має групи механічних елементів різного походження, наприклад, пластинчаста коленхіма, але сукупність механічних елементів вторинної структури набагато більша. Зовнішній шар перициклічної зони вторинної кори складається з груп клітин склеренхіми та паренхіми, які чергуються. Вторинна флоема теж має механічні елементи – прошарки склеренхіми, які перетинають поперек ділянки флоєми, це васкулярна склеренхіма, яка утворює твердий луб. Також вторинні зміни торкаються ксилеми, викликаючи склерифікацію судинних пучків [34, 52]. Склерифікація васкулярних елементів може стримувати розвиток структур кореневого зачатку. На стадії утворення зрілої гістоструктури апекса відбувається морфологічне відокремлення та ендогенний ріст зачатку придаткового кореня серед тканин кори стебла. Але периваскулярна склеренхіма є тією тканиною, яка перешкоджає ендогенному росту примордія, а також виходу зачатку на поверхню тканин стебла [41].

Обговорення результатів дослідження. Потрібно зазначити, що у роботі О. В. Колчанової (2018) із досліджування приживлюваності сортів фундука за часткою вкорінених живців у процесі зеленого живцювання, приживлюваність сортів 'Велетень', 'Харків-4', 'Лозівський кулеподібний' та 'Пірожок' становила 36 %, 64 %, 22,7 % та 20 % відповідно. Серед усіх культиварів, що досліджувались, 'Велетень' та 'Харків-4' мали відносно високі показники, навпроти, показники сортів 'Лозівський кулеподібний' та 'Пірожок' відповідали достатньо низькій відносній приживлюваності живців [28].

Також у процесі дослідження ефективності застосування препаратів-стимуляторів коренеутворення на основі комбінацій синтетичних аналогів ауксинів, цитокінінів – "Grandis" та "Чаркор" О. В. Колчановою (2018) вивчалась відповідь зелених живців різних сортів на використання препаратів, яка виявлялась у посиленні коренеутворення порівняно із контролем. Було встановлено, що найвищий ступінь реагування на застосування екзогенних регуляторів росту виявляли сорти 'Лозівський кулеподібний' та 'Харків-4', в яких перевищення показників вкорінюваності, порівняно із контролем було у 1,5 ('Лозівський кулеподібний') та 2 ('Харків-4') рази. Сорти 'Велетень' та 'Пірожок' не демонстрували відповіді на застосування гормональних стимуляторів ризогенезу [28].

В роботі S. K. Kiran et al. (2021) у процесі мікроклонального розмноження *C. avellana* L. семи різних культиварів із використанням культур зародків і меристем встановили, що найвищі показники регенерації меристем – 68-94 %, а також проліферації і розвитку тканин зародків можна отримати із застосуванням саме середовища WPM [27]. У роботі [55] в процесі МКР фундука шляхом мікроживцювання також використовували WPM як поживне середовище. У роботі [59] в процесі МКР мікроживцюванням *C. avellana* L. вивчали вплив концентрацій азоту на коренеутворення. Ними було отримано дані, що найвищі відсотки укорінення спостерігаються при низькому рівні азоту у середовищі, за використанням KNO_3 у концентраціях 475 та 950 мг/л. Показники вкорінення мікроживців на рівні 87 % було отримано при застосуванні поживного середовища $\frac{1}{2}$ MS із використанням як джерела азоту KNO_3 у концентрації 475 мг/л. Найнижча частка вкорінення (22 %) була

при застосуванні середовища із додаванням 825 мг/л NH_4NO_3 та 950 мг/л KNO_3 [59]. Нами було отримано високі показники регенерації експлантів за використанням поживного середовища із вмістом NH_4NO_3 – 100 мг/л. Це підтверджується даними [48], які вивчали ефективність використання середовищ MS, WPM, DKW у процесі МКР фундука, про те, що кращий морфогенетичний розвиток експлантів відбувається на поживних середовищах зі зменшеними до $\frac{1}{2}$, або навіть $\frac{1}{5}$ базовими концентраціями макро- та мікроелементів.

У роботах R. P. Pincelli-Souza et al. (2018) та C. Silvestri et al. (2019) у процесі клонального розмноження фундука шляхом живцювання в умовах *in vitro* також найкращі результати із регенерації експлантів було отримано із застосуванням 6-БАП із групи цитокінінів на стадії проліферації пагонів і ІМК (у концентрації 1 мг/л) як ауксину, для індукції ризогенезу [55, 59]. Автори C. Silvestri et al. (2019) використовували меншу концентрацію ІМК на стадії ризогенезу, за якою отримували високі показники вкорінення, до 87 %. Але ауксини у середовищі культивування було застосовано ними без одночасного додавання у середовище цитокінінів, оскільки 6-БАП був присутній у поживному середовищі на попередній стадії культивування [59]. Вірогідно, з тієї причини менші концентрації ІМК, ніж ті, що застосовані нами, були ефективними у процесі ризогенетичного розвитку. Нами було застосовано одночасне додавання у середовище культивування ауксинів і цитокінінів у вигляді комбінації 6-БАП та ІМК, тому, можливо, що нам для отримання високих показників ризогенезу необхідно використовувати більш високі (вищі за 1 мг/л) концентрації ІМК для зменшення антагоністичного ефекту.

Мацкевич В. В. (2022), який у своїй роботі аналізує ефективність застосування рослинних гормонів для клонального розмноження мигдалю та фундука, згадує, що застосування ІМК у концентрації 2 мг/л є оптимальним для процесу коренеутворення [44].

Отже, за результатами виконаної роботи можна сформулювати такі наукову новизну та практичну значущість результатів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів дослідження – удосконалено метод клонального розмноження фундука шляхом активації розвитку існуючих меристем пазушних бруньок на вихідному експланті, який вводиться до культури *in vitro* та паралельному стимулюванню в нього адвентивного ризогенезу, за рахунок використання технології вирощування маточних рослин у закритих умовах, використання як стериліантів антисептичних препаратів, що використовують у фармакології та застосування комбінацій регуляторів росту рослин у поживних середовищах, здатна забезпечити швидкий двосторонній морфогенез і отримання рослин-регенерантів з утвореними за один безперервний цикл культивування пагоном та коренем.

Практична значущість результатів дослідження – за рахунок підвищення ефективності технології клонального розмноження фундука шляхом удосконалення методу стерилізації та скорочення часу культивування, шляхом прискорення морфогенезу, для швидкого отримання кореневласних рослин-регенерантів, наданий метод має можливість конкурувати з іншими техніками масового розмноження фундука вегетативним шляхом.

Висновки / Conclusions

Проведено оцінювання здатності до загального морфогенетичного розвитку та здатності до адвентивного ризогенезу стеблових живців різних сортів фундука у процесі клонального розмноження в умовах *in vitro*, що дає можливість підвищити ефективність клонального розмноження фундука в умовах *in vitro* за рахунок оптимізації окремих стадій процесу. За результатами проведеного дослідження можна зробити такі основні висновки.

1. В ході оцінювання впливу екзогенних регуляторів росту рослин на ризогенетичну здатність експлантів фундука у процесі клонального розмноження шляхом живцювання в умовах *in vitro* було встановлено, що використання ІОК та НОК з групи ауксинів не є ефективним, оскільки застосування у складі всіх комбінацій тільки ІОК або у поєднанні ІОК із НОК не давало показників регенерації вищих за 55 %. Найнижчі показники регенерації було відзначено при одночасному застосуванні ІОК та НОК та у комбінаціях із 6-БАП та кінетином: ІОК + 6-БАП; ІОК + кінетин; ІОК + НОК + кінетин – 16,4-55 %. Застосування ІМК як ауксину, навпаки, давало змогу отримати високі відсотки регенованих рослин, особливо у комбінації із 6-БАП як цитокініну, але при поєднанні ІМК із кінетином ефективність середовищ знижувалась – 38,26-77,54 %. При застосуванні ІМК у поєднанні із 6-БАП найвищу ефективність демонстрували комбінації, в яких концентрації ІМК були не меншими 1,0 мг/л – 52,01-96,24 % регенерації. При зниженні вмісту ІМК у середовищах (0,5 та 0,8 мг/л) відсотки регенерації також зменшувались – 34,08-88,28 %.

2. З'ясовано, що ефективність використання кінетину у процесі клонального розмноження фундука нижча, ніж за використання інших фітогормонів з групи цитокінінів, і складає не більше 70,92 % регенованих рослин, тільки у випадку із одночасною присутністю у середовищі кінетина та 6-БАП максимальні показники регенерації дорівнювали 84,25 %. Порівняно, застосування іншого типу цитокініну – 6-БАП у комбінації із ауксинами, давало змогу отримати до 96,24 % регенованих рослин.

3. Було отримано найвищі показники регенерації експлантів фундука із використанням середовищ на основі ІМК та 6-БАП. При одночасному застосуванні 6-БАП у концентраціях 0,1, 0,2 та 0,4 та ІМК у концентраціях 1,0, 2,0 та 5,0 мг/л показники склали 92,89 %, 96,24 % та 89,95 % відповідно.

4. За отриманими результатами встановлено залежність показників адвентивного ризогенезу не тільки від концентрації ауксинів і цитокінінів у середовищі і їх взаємного співвідношення, але й від типу ауксину – цитокініну.

5. Вивчено залежність сили відповіді експлантів фундука на застосування екзогенних РРР від генотипу. Отримані дані свідчать, що загальна тенденція зберігалась для експлантів всіх сортів, незалежно від варіанту дослідження. У кожному варіанті поживного середовища показники регенерації були вищими для сортів 'Велетень' та 'Харків-4'.

6. У процесі клонального розмноження було порівняно ефективність застосування комбінованого методу клонального розмноження в умовах *in vitro* для різних сортів фундука. Найкращі показники морфологічного

розвитку, зокрема адвентивного ризогенезу, було отримано для сортів 'Велетень' та 'Харків-4', для яких ПТУ у окремих варіантах дослідження був більшим за 60 %. Отримані дані дали можливість припустити зв'язок морфогенетичної активності експлантів із генотипом.

7. Було визначено, що використання комбінованого методу із одночасним поєднанням методів стимулювання адвентивного ризогенезу та індукції гомогенезу у первинних експлантів, шляхом зняття апікального домінування, дає змогу отримати достатньо високі показники морфологічного розвитку експлантів.

8. Головними факторами, які визначають ризогенетичну здатність експлантів є фізіологічний стан тканин материнської рослини, а саме ступінь сезонної активності камбіальної зони, та стан паренхіми і провідних елементів стебла. У процесі утворення та розвитку додаткових коренів основну роль відіграє анатомічна будова живця, відібраного, для уведення у культуру, а саме, специфіка розташування у просторі та розміри серцевинних променів.

References

- Andres, H., Fernandez, B., Rodriguez, R., & Rodriguez, A. (2002). Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(2), 173–180.
- Baraldi, R., Bertazza, G., Bregoli, A., Fasolo, F., & Rotondi, A. (1995). Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on micro cutting soft pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(1), 49–59. <https://doi.org/10.1007/BF00212646>
- Basil, N., Mok, D., Mok, M., & Rebhuhn, B. (1992). Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana*. *Acta Horticulturae*, 300(300), 137–140. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.300.17>
- Bryant, P. H., & Trueman, S. J. (2015). Stem anatomy and adventitious root formation in cuttings of *Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests*, 6(4), 1227–1238. <https://doi.org/10.3390/f6041227>
- Bryon, O. V., & Chikalenko, V. G. (1992). Anatomy of plants. Kyiv: High school, 272 p. [In Ukrainian]
- Chornobrov, O. Yu. (2016). Biotechnological features of microclonal reproduction of plants of the genus *Salix* L. *Scientific Bulletin of UNFU*, 26(7), 171–179. <https://doi.org/10.15421/40260727>
- Chornobrov, O. Yu. (2017). The effect of growth regulators on the regenerative capacity of explants of *Quercus Robur* L. plants *in vitro*. *Bioresources and nature management*, 9(3–4), 13–19. [In Ukrainian]
- Chornobrov, O. Yu. (2017). The use of *in vitro* tissue culture methods for the propagation of culm var plants *Populus x Canadensis moench*. *Scientific Bulletin of UNFU*, 27(6), 51–54. <https://doi.org/10.15421/40270610>
- Cristofori, V., Carelli, P., Rugini, E. (2009). Effects of auxine and putrescine treatments on rooting of leafy cuttings of three hazelnut cultivars. *Acta Horticulturae*, 845(845), 267–272. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.845.38>
- Cristofori, V., Roupheal, Y., & Rugini, E. (2010). Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Scientia Horticulturae*, 124(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2009.12.034>
- Custodio, L., Martins-Loucao, M., & Romano, A. (2004). Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Plant Biology*, 48(3), 469–472. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041107.23191.8c>
- Druart, P. (1982). *In vitro* promotion of root formation by apply shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1085, 429–436. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(82\)80168-2](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80168-2)

13. Druege, U. (2016). Physiological and molecular control of adventitious root formation in ornamental cuttings. *Leibniz Universität Hannover*, 78 p. URL: https://www.repo.uni-hannover.de/bitstream/handle/123456789/7712/Druege_Habil.pdf?sequence=4&isAllowed=1
14. Druege, U., Franken, P., & Hajirezaei, M. (2016). Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00381>
15. Gao, X., Liu, J., & Ling, Q. (2008). Tissue culture and rapid propagation of hybrid hazelnut (*Corylus heterophylla* × *C. avellana*). *Acta Horticulturae*, 771(2), 207–211. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.771.30>
16. Gaur, A., Kumar, P., Thakur, A., & Srivastava, D. (2016). *In vitro* plant regeneration studies and their potential applications in *Populus* spp.: a review. *Israel journal of plant sciences*, 63(2), 77–84. <https://doi.org/10.1080/07929978.2015.1076982>
17. Gehlot, A., Gupta, R. K., Arya, I. D., Arya, S., & Tripathi, A. (2014). De novo adventitious root formations in mini-cuttings of *Azadirachta indica* in response to different rooting media and auxin treatments. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 8(4), 558–564. <https://doi.org/10.3832/for1189-007>
18. Geiss, G., Gutierrez, L., Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews: Root Development*, 37, 127–156. <https://doi.org/10.1002/9781444310023.ch5>
19. Hand, C., & Reed, B. (2014). Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(2), 427–439. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0545-x>
20. Hand, C., Maki, S., & Reed, B. (2014) Modeling optimal mineral nutrition for hazelnut micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(2), 411–425. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0544-y>
21. Huh, Y. S., Lee, J. K., & Nam, S. Y. (2017). Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 335–342. <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.335>
22. Jyoti, L., Mukund, R., & Praveen, K. (2016). An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *HomeBotany*, 94(1). <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0111>
23. Kalinin, F. L., Kushnir, G. P., & Sarnatskaya, V. V. (1992). Plant micropropagation technology. Kiev: Scientific thought, 232 p. [In Russian]
24. Kalinin, F. L., Sarnatskaya, V. V., & Polishchuk, V. E. (1980). Tissue culture methods in plant physiology and biochemistry. Kiev: Scientific thought, 488 p. [In Russian]
25. Kefeli, V. I., & Kalevitch, M. V. (2003). Natural growth inhibitors and phytohormones in plant and environment. *Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, 96–105. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0315-4>
26. Khudoleeva, L. V., Kutsokon, N. K., & Nesterenko, O. G. (2017). In vitro cultivation of poplar and willow clones promising for renewable energy. *Biological systems*, 9(1), 18–22. [In Ukrainian]
27. Kivrak Kiran, S., Galatali, S. Yeniocak, S., & Ozkaya, D. (2021). Investigation of modified WPM medium for the best meristem proliferation of *Corylus avellana* L. *Advances in Horticultural Science*, 35(3), 285–292. <https://doi.org/10.36253/ahsc-10536>
28. Kolchanova, O. V. (2018). The results of survival of hazelnut varieties during green cuttings in greenhouses with mist irrigation in the conditions of Vinnytsia. *Scientific Bulletin of UNFU*, 28(3), 30–33. <https://doi.org/10.15421/40280306>
29. Kolchanova, O. V., & Obozny, O. I. (2015). Peculiarities of introduction into *in vitro* culture of representatives of the genus *Corylus*. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine. Biology series*, 3(36), 91–97. [In Ukrainian]
30. Kolesnichenko, O. V., Slyusar, S. I., & Yakobchuk, O. M. (2008). Methodical recommendations for the propagation of woody ornamental plants of the Botanical Garden NUBiP of Ukraine. Kyiv: NUBiP of Ukraine, 29 p. [In Ukrainian]
31. Kosenko, I. S., & Opalko, A. I. (2007). Vegetative propagation of *Corylus* L. through tissue culture. *Bull. of bot. gard., mus., & collect.: Ann. of the Polish bot. soc.*, 16A, 48.
32. Kosenko, I. S., Boyko, A. L., Opalko, A. I., Nebykov, M. V., & Tarasenko, G. A. (2009). Micropropagation of *Corylus colurna* L. *Acta Horticulturae*, 845, 261–266. URL: https://www.actahort.org/books/845/845_37.htm
33. Kosenko, I. S., Opalko, A. I., & Nebykov, M. V. (2008). Regeneration of plants in the process of microclonal reproduction. Autochthonous and introduced plants. Collection of sciences. Proceedings of the National Peoples Party "Sophiivka" of the National Academy of Sciences of Ukraine, Vol. 3–4, 57–67. [In Ukrainian]
34. Krasilnikova, L. O., & Sadovnichenko, Yu. O. (2007). Anatomy of plants. Plant cell, tissues, vegetative organs. Kharkiv: Osnova, 238 p. [In Ukrainian]
35. Kreiser, M., Giblin, C., Murphy, R., & Fiesel, P. (2016). Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid in shoot tissue of hazelnut (*Corylus*) and elm (*Ulmus*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 35 (3), 710–721. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9574-5>
36. Kushnir, G. P., & Sarnatska, V. V. (2005). Microclonal propagation of plants. Theory and practice. Kyiv: Scientific thought, 235 p. [In Ukrainian]
37. Lisovyi, M. M. (2021). The effect of growth stimulants on the rhizogenesis of *Thuja occidentalis* L. clones in conditions *in vitro*. *Scientific Bulletin of UNFU*, 31(3), 9–13. <https://doi.org/10.36930/40310301>
38. Liu, X., Barkawi, L., Gardner, G., & Cohen, J. (2012). Transport of indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid in Arabidopsis hypocotyls using stable isotope labeling. *Plant Physiology*, 158(4), 1988–2000. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191288>
39. Los, S. A., Slyusarchuk, V. E., Kravchenko, L. I., & Guseva, E. V. (2021). Propagation of hazelnut varieties by vertical cuttings using construction netting in Kharkiv region. *Forestry and agroforestry*, 138, 41–48. <https://doi.org/10.33220/1026-3365.138.2021.41>
40. Los, S. A., Vysotska, N. Yu. Tereshchenko, L. I., & Torosova, L. O. (2018). Results and prospects of variety testing of forest and nut-bearing tree plants in Ukraine. *Materials of the conference "Breeding achievements in Ukraine: problems of legal protection and prospects for improving protection"*, 14–18. [In Ukrainian]
41. Lovell, P. H., & White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In: Jackson, M. B. (Eds) *New Root Formation in Plants and Cuttings. Developments in Plant and Soil Sciences*, 20, 111–140. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4358-2_4
42. Mardani, N., Khadivi, A., & Vatanpour-Azghandi, A. (2019). Micropropagation of Three Commercial Cultivars of Hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Gesunde Pflanzen*, 72, 41–46. <https://doi.org/10.1007/s10343-019-00481-7>
43. Marks, T. R., & Simpson, S. E. (2000). Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting *in vitro* in a range of difficult and easy-to-root woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(1), 65–74.
44. Matskevich, V. V., Kimeychuk, I. V., Matskevich, O. V., & Shita, O. P. (2022). World experience, prospects of hazelnut and almond breeding in Ukraine. *Agrobiologia*, 1, 179–191. <https://doi.org/10.33245/2310-9270-2022-171-1-179-191>
45. McCown, B., & Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. *HortScience*, 16(3), 453–453.
46. Mehlenbacher, S. (1991). Hazelnuts (*Corylus*). *Acta Horticulturae*, 290, 791–838. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.18>
47. Mitrofanova, I. V. (2011). Somatic embryogenesis and organogenesis as the basis of biotechnology for the production and preservation of perennial horticultural crops. Kiev: Agrarian science, 344 p. [In Russian]

48. Nas, M., & Read, P. (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae*, 101(1-2), 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.004>
49. Newell, C., Growns, D., & McComb, J. (2005). A novel *in vitro* rooting method employing aerobic medium with wide application to the Australian flora. *Aust. Journal of Botany*, 53(1), 81–89. <https://doi.org/10.1071/BT04061>
50. Niki, T., Mitsuhashi, L., Seo, S., Ohtsubo, N., & Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 500–507.
51. Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), 1537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
52. Panyuta, O. O., & Olkhovich, O. P. (2009). *Anatomy of plants*. Kyiv: Roda, 272 p. [In Ukrainian]
53. Perez, C., Rodriguez, R., & Tames, R. (1985). *In vitro* filbert (*Corylus avellana*, L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. *Plant Cell Reports*, 4(3), 137–139. <https://doi.org/10.1007/BF00571300>
54. Pincelli-Souza, R., Moreira, L., & Cohen, J. (2022). Improvements for the Micropropagation of Hybrid Hazelnut (*C. americana* × *C. avellana*). *Horticulturae*, 8(9), 849. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090849>
55. Pincelli-Souza, R., Tillmann, M., Esler, M., Alves, C., & Cohen, J. (2018). Hybrid hazelnut: micropropagation, rooting and acclimatization. *Acta Horticulturae*, 1191, 113–120. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1191.16>
56. Sergienko, N. V. (2011). Specificity of shoot formation *in vitro* in representatives of the genus *Corylus* L. Autochthonous and introduced plants, 7, 110–114. [In Ukrainian]
57. Sgueglia, A., Gentile, A., Frattarelly, A., & Urbinati, G. (2018). Micropropagation of Sicilian cultivars with an aim to preserve genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana*, L.). *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(2), 1–5. <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1549600>
58. Sharma, N., & Chandel, K. (1992). Effects of ascorbic acid on axillary shoot induction in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(2), 109–113.
59. Silvestri, C., Rugini, E., & Cristofori, V. (2019). The effect of Cu-SO₄ for establishing *in vitro* culture, and the role nitrogen and iron sources in *in vitro* multiplication of *Corylus avellana*, L. cv. Tonda Gentile Romana. *Plant biosystems – An international journal dealing with all aspects of plant biology*, 154(1), 17–23. <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1549610>
60. Steffens B, Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>
61. Strader, L., & Bartel, B. (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular Plant*, 4(3), 477–486. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr006>
62. Su, Y., Liu, Y., & Zhang, X. (2011). Auxin – cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
63. Thomson, G., & Deering, T. (2011). Effect of cytokinin type and concentration on *in vitro* shoot proliferation of hazelnut (*Corylus avellana*, L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 39(3), 209–213. <https://doi.org/10.1080/01140671.2011.559253>
64. Woodward, A., & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>

Yu. S. Lysak

*Ukrainian Order "Sign of Honour" Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after,
G. M. Vysotsky, Kharkiv, Ukraine*

SOME FEATURES OF THE TECHNOLOGY OF HAZELNUT CLONAL PROPAGATION BY CUTTINGS *IN VITRO* AND WAYS TO INCREASE ITS EFFICIENCY

The process of clonal propagation of such hazelnut varieties as 'Veleten', 'Kharkiv-4', 'Lozivsky sharovidny', 'Pirozhok' was investigated by means of parallel stimulation of the processes of adventitious rhizogenesis and hemogenesis *in vitro*. Some fragments of cuttings were used as explants. In the course of the work, the influence of WPM (*Woody Plant Medium*) with a 75 % reduced content of macro- and microelements on the morphogenetic development of explants was studied. The effectiveness of adding exogenous plant growth regulators to the cultivation medium was also investigated in terms of explant regeneration indicators, in particular the ability to adventitious rhizogenesis. The effect of combinations of different types of auxins/cytokinins on regeneration parameters was compared, and their stimulating effect on the process of adventitious rhizogenesis was evaluated. The following results were obtained: the use of WPM nutrient medium with a reduced concentration of inorganic compounds allowed obtaining regeneration rates of explants higher than 90 %, the highest percentage of rhizogenetically active explants was obtained when using combinations of IBA as auxin in concentrations of 1.0, 2.0 and 5.0 mg/l and cytokinin 6-BAP in concentrations of 0.1, 0.2 and 0.4 mg/l in the nutrient medium – 92.89, 96.24 and 89.95 %, conversely, the addition of IAA to the nutrient medium as auxin and kinetin from the group of cytokinins reduced regeneration rates. In the process of additional research on the rhizogenetic ability of explants based on the qualitative integrated index of rooting (IIR), we concluded that explants of the varieties 'Veleten' and 'Kharkiv-4', which had an IIR value higher than 60 %, have the highest regeneration potential.

Keywords: hazelnut explants; nutrient medium; morphogenetic development; adventitious rhizogenesis; hemogenesis; regenerative ability; apical meristem; adventitious roots formation; primordium; cambial layer.