

# ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Научная статья  
УДК 634.54:631.526.32:632.35:581.143.6  
DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-50-60



## Активность геммогенеза растений-регенерантов сорта фундука 'Академик Яблоков' и антибиотикотерапия для элиминации бактериальной инфекции в условиях *in vitro*

Т. А. Красинская

Институт плодоводства, Самохваловичи, Беларусь

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Анатольевна Красинская, [tatsiana.krasinskaya@gmail.com](mailto:tatsiana.krasinskaya@gmail.com)

**Актуальность.** Для расширения промышленных и приусадебных насаждений сортов фундука в Беларуси актуален вопрос получения сертифицированного посадочного материала биотехнологическими методами.

**Материалы и методы.** Растения-регенеранты сорта фундука 'Академик Яблоков', как представителя рода *Corylus L.*, являлись модельным объектом изучения морфогенеза в культуре *in vitro* и эффективности антибиотиков для элиминации бактериальной инфекции с целью разработки протокола получения оздоровленного посадочного материала сортов фундука. Полученные в ходе исследования растения включены в состав дублетной коллекции орехоплодных культур, сохраняющихся *in vitro* в состоянии активного роста.

**Результаты.** Антибиотик канамицина моносульфат в концентрации 100 мг/л при однократном воздействии в процессе антибиотикотерапии на этапе микроразмножения *in vitro* элиминировал бактериальную инфекцию у 83,3% растений-регенерантов, а при двукратном воздействии – у 100%. Дальнейшее культивирование выявило его фитотоксичное поствлиание, проявляющееся в виде некроза большей части растений-регенерантов и снижения активности процессов геммогенеза и роста. Цефотаксима натриевая соль в концентрации 90 мг/л не элиминировала бактериальную инфекцию как при однократном, так и при двукратном воздействии; активность геммогенеза и роста растений-регенерантов сохранялась при последующем культивировании на средах без антибиотиков. Наилучшие показатели развития отмечались на модифицированной среде Мурасиге – Скуга (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 2,2 шт., микрочеренков – 2,3 шт.) и на модифицированной среде DKW (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 2,05 шт., микрочеренков – 2,9 шт.) с гормональным составом 6 мг/л 6-БА, 0,01 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>. Использование зеатина в качестве цитокинина для стимуляции адвентивного морфогенеза или активации роста пазушных меристем в концентрации 5 и 6 мг/л малоэффективно по сравнению с 6-БА.

**Ключевые слова:** культура *in vitro*, *Corylus L.*, фундук, микроразмножение, антибиотикотерапия

**Благодарности:** работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы (номер госрегистрации 20201691) «Расширить сортимент фундука для промышленного и приусадебного возделывания за счет создания технологичных и высокопродуктивных сортов, разработать приемы их размножения, производства и хранения орехов». Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

**Для цитирования:** Красинская Т.А. Активность геммогенеза растений-регенерантов сорта фундука 'Академик Яблоков' и антибиотикотерапия для элиминации бактериальной инфекции в условиях *in vitro*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(3):50-60. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-50-60

## STUDYING AND UTILIZATION OF PLANT GENETIC RESOURCES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-50-60

### Activity of gemmogenesis in regenerated plants of hazelnut cv. 'Akademyk Yablokov' and antibiotic therapy for elimination of bacterial contamination *in vitro*

Tatsiana A. Krasinskaya

*Institute for Fruit Growing, Samokhvalovichi, Belarus*

**Corresponding author:** Tatsiana A. Krasinskaya, [tatsiana.krasinskaya@gmail.com](mailto:tatsiana.krasinskaya@gmail.com)

**Background.** The problem of obtaining certified planting material with biotechnological methods is important for expanding commercial and homestead plantations of hazelnut cultivars in Belarus.

**Materials and methods.** Regenerated plants of cv. 'Akademyk Yablokov', representing the genus *Corylus* L., were a model object for studying *in vitro* morphogenesis and effectiveness of antibiotics against bacterial contamination, so that a protocol could be developed to obtain healthy planting material of hazelnut cultivars. The plants produced during this study were included in the duplicate *ex situ* collection of nut crops preserved *in vitro* in the active growth state.

**Results.** Single exposure to the antibiotic kanamycin monosulfate at a concentration of 100 mg/L during antibiotic therapy in the stage of *in vitro* micropropagation eliminated bacterial infection in 83.3% of regenerated plants, and twofold exposure in 100%. Further cultivation revealed its phytotoxic aftereffect manifested in the form of necrosis on most of the regenerated plants and a decrease in the activity of gemmogenesis and growth. Neither single nor twofold exposure to cefotaxime sodium salt at a concentration of 90 mg/L caused elimination of bacterial infection, but gemmogenesis and regenerated plant growth retained their activity during subsequent cultivation on antibiotic-free media. The best development parameters were observed on a modified Murashige–Skoog medium with 6 mg/L 6-BA, 0.01 mg/L IBA, and 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> (average number of shoots: 2.2; number of microcuttings: 2.3), and a modified DKW medium with 6 mg/L 6-BA, 0.01 mg/L IBA, and 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> (average number of shoots: 2.05; microcuttings: 2.9). The use of zeatin as a cytokinin to stimulate adventitious morphogenesis or activate the growth of axillary meristems at a concentration of 5 or 6 mg/L was not as effective as 6-BA.

**Keywords:** *in vitro* culture, *Corylus* L., hazelnut, micropropagation, antibiotic therapy

**Acknowledgements:** the research was carried out within the framework of the scientific project (State Registration No. 20201691) entitled "To expand the hazelnut assortment for commercial and homestead cultivation through the development of high-tech and high-yielding cultivars, and work out the methods for their propagation, production, and nut storage". The author thanks the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**For citation:** Krasinskaya T.A. Activity of gemmogenesis in regenerated plants of hazelnut cv. 'Akademyk Yablokov' and antibiotic therapy for elimination of bacterial contamination *in vitro*. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(3):50-60. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-50-60

## Введение

Коллекции плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда Республиканского научно-производственного дочернего унитарного предприятия «Институт пловодства» Национальной академии наук Беларуси объявлены национальным достоянием (постановление Совета Министров Республики Беларусь № 1152 от 14.12.2012) и включены в Государственный реестр научных объектов, которые составляют национальное достояние, под реестровым номером 6. Данная коллекция по составу культур и видов не имеет аналогов в Беларуси, в то время как дублетные коллекции в других организациях республики насчитывают не более 250 образцов каждая.

Коллекционные фонды сохраняются в живом виде (по 3–6 растений каждого образца) в полевых условиях (*in situ*) на площади 20 га (аг. Самохваловичи, Минский район). В отделе биотехнологии Института пловодства заложена дублетная коллекция в состоянии активного роста, сохраняющаяся в условиях *in vitro* при температуре +23...+25°C, которая ежегодно пополняется. На 1 января 2024 г. коллекция включала в себя 52 образца, каждый – по 10 растений (*Pyrus* L. – 5 образцов, *Prunus* L. – 5, *Vitis* L. – 3, *Fragaria* L. – 10, *Lonicera* L. – 5, *Rubus idaeus* L. – 8, *Rubus caesius* L. – 3, *Amelanchier* Medik. – 4, *Chaenomeles* Lindl. – 2, *Acca O. Berg* – 1, *Aronia* Mich. – 2, *Malus* Mill. – 2 и *Corylus* L. – 2 (сорта 'Академик Яблоков' и 'Барселонский'). Коллекция *in vitro* ежегодно пополняется и представлена образцами различного эколого-географического происхождения (18 образцов в данной коллекции являются сортами белорусской селекции).

Наличие в дублетной коллекции в условиях *in vitro* двух сортов фундука объясняется трудностью получения стерильных и жизнеспособных эксплантов данной культуры из-за ряда специфичных проблем. Ряд исследований подтверждают, что наличие скрытой бактериальной инфекции, дрожжей, высокая активность синтеза фенолов эксплантами, их некротизация сдерживают получение жизнеспособной стерильной культуры растений (Voxus, Terzi, 1988; Reed et al., 1998; Silvestri et al., 2019).

В отделе биотехнологии активно ведутся работы по разработке протокола получения сертифицированного посадочного материала сортов фундука европейской и белорусской селекции с помощью культуры *in vitro*. Актуальность данных работ определяется большим спросом на безвирусный посадочный материал для закладки промышленных насаждений фундука районированными в Беларуси сортами: 'Каталонский', 'Барселонский', 'Косфорд', 'Лал'®, 'Яшма'®, Аркадий (проходит испытание в ГИИОСР). С целью расширения дублетной коллекции фундука планируют включить в нее сорта российской, итальянской, американской, грузинской и азербайджанской селекции. Для этого необходим подбор оптимальных условий культивирования в условиях *in vitro* для каждого из сортов.

Проблема получения стерильных эксплантов фундука заключается в том, что инфицирование не всегда можно обнаружить на стадии инициации культуры, некоторые внутренние патогены можно визуализировать на более поздних пассажах и они с трудом поддаются элиминации (Silvestri et al., 2019). Поверхностная стерилизация эксплантов растений и соблюдение правил антисептики не являются гарантией отсутствия так называемых скрытых (эндофитных) бактерий в культурах *in vitro* (Leifert et al., 1991; Dunaeva, Osledkin, 2015).

При культивировании растений *in vitro* стойкое бессимптомное бактериальное присутствие обусловлено, с одной стороны, подавлением роста бактерий факторами, сопутствующими культивированию эксплантов растений (рН, температура ниже бактериального оптимума, активация защитных механизмов), а с другой стороны – одновременной поддержкой бактерий за счет экссудатов, выделяемых эксплантами самих растений (Dunaeva, Osledkin, 2015).

Для элиминации бактериальной контаминации в культуре *in vitro* используют антибиотики, которые одновременно должны обладать бактерицидным действием, быть недорогими, нетоксичными для человека, растворимыми в среде и не влиять на ее рН (Thomas et al., 2006). Кроме того, эффективность антибиотикотерапии определяется не только типом и концентрацией антибиотиков, а также их экспозицией, но и видом самого растения (Voxus, Terzi, 1988; Orlikowska et al., 2017).

Выбор наиболее активных антибиотиков широкого спектра действия успешен, если идентифицированы целевые бактерии (Leifert et al., 1991). Barbara M. Reed с коллегами выделили из культуры растений-регенерантов фундука и идентифицировали следующие бактерии: *Agrobacterium radiobacter* B, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas* spp., *Enterobacter asburiae*, *Flavobacterium* spp. и *Alcaligenes* spp. (Reed et al., 1998).

Для элиминации грибной инфекции эффективными средствами явились коммерческие препараты «Клад», «Ламадор» и «Сценик Комби», в водных растворах которых экспланты фундука сорта 'Трапезунд' предварительно замачивали на 24 часа: доля стерильных эксплантов составила 42 и 44% в зависимости от препарата, в то время как в контрольном варианте стерильных эксплантов получено не было (Rakhmangulov et al., 2019).

Для сохранения растений-регенерантов фундука в культуре *in vitro* важно подобрать минеральный и гормональный составы среды, которые будут обеспечивать максимальный коэффициент размножения морфологически хорошо развитых микрорастений. В качестве цитокинина для микроразмножения фундука используется 6-бензиламинопури (6-БА), реже – зеатин (Pincelli-Souza et al., 2022). В зависимости от генотипа фундука применяют широкий диапазон концентраций 6-БА – от 1 до 5 мг/л (Seitmamutova et al., 2021). Нередко цитокинины используются в комбинации с другими фитогормонами: ауксинами (индолил-3-масляная, индолил-3-уксусная и  $\alpha$ -нафтилуксусная кислоты – ИМК, ИУК и НУК), кинетином и гибберелловой кислотой (ГК<sub>3</sub>) (Seitmamutova et al., 2021; Yahyaoui et al., 2021).

Минеральный состав сред, используемый на этапе микроразмножения, также разнообразен в зависимости от генотипа растений фундука. В протоколе Европейской и средиземноморской организации по карантину и защите растений (EPPO) для получения растений в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения и элонгации рекомендуется ½ Мурасиге – Скуга (MS) с модификациями (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2004). Для азербайджанских, итальянских сортов оптимальным минеральным составом для эффективного роста и развития растений-регенерантов отметились среды Driver and Kuniyuk Walnut (DKW) и Nas and Reed Medium (NRM) (Seitmamutova et al., 2021; Yahyaoui et al., 2021). Для гибридов фундука успешно использовали среду Lloyd&McCown Woody Plant Basal Medium (WPM) (Pincelli-Souza et al., 2022).

*Цель работы* – изучить влияние канамицина моносульфата и цефотаксима натриевой соли на элиминацию бактериальной инфекции и установить оптимальный состав питательных сред для культивирования и сохранения растений-регенерантов сорта фундука 'Академик Яблоков' в качестве дублетной коллекции в состоянии активного роста в условиях *in vitro*.

### Материалы и методы

Объект исследования – растения-регенеранты красностебельного сорта фундука 'Академик Яблоков', свободные от основных сокопереносимых вирусов: вируса мозаики яблони (ArMV), вируса некротической кольцевой пятнистости сливы (PNRSV). Маточные растения предварительно тестировали с помощью DAS-ELISA наборами фирмы Bioreba (Швейцария). Согласно международному протоколу EPPO данные вирусы должны отсутствовать в сертифицированном посадочном материале (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2004).

*Опыт 1. Антибактериальная терапия растений-регенерантов в культуре in vitro на этапе микроразмножения при однократном и двукратном воздействии антибиотиков.*

Антибактериальную терапию растений-регенерантов в культуре *in vitro* проводили двумя способами:

- однократное воздействие антибиотиком на растения-регенеранты (длительность беспересадочного культивирования при однократном воздействии антибиотиков – 36 дней);
- двукратное воздействие антибиотиком на растения-регенеранты (длительность беспересадочного культивирования при двукратном воздействии антибиотиков: первое культивирование – 35 дней; второе – 46 дней).

Среды для антибиотикотерапии:

- модифицированная питательная среда MS с содержанием 5 мг/л 6-БА (производитель Acros Organics), 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> (производитель Alfa Aesar) и 0,01 мг/л ИМК (производитель Alfa Aesar), 4 таблетки нистатина/л (500 000 ЕД) (производитель ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов») с добавлением 90 мг/л цефотаксима натриевой соли (производитель Duchefa Biochemie®), pH 5,52;
- модифицированная питательная среда MS с содержанием 5 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 4 таблетки нистатина/л (500 000 ЕД) с добавлением 100 мг/л канамицина моносульфата (производитель Duchefa Biochemie®), pH 5,52.

Нистатин в питательную среду добавляли как антигрибковый препарат для сдерживания развития инфекционного фона в культуре *in vitro*. Концентрации антибиотиков для эксперимента определялись согласно рекомендациям производителя антибиотиков Sigma-Aldrich® при работе с культурой клеток (<https://www.sigmaaldrich.com/by/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/plant-tissue-culture/antibiotics>).

Антибиотики в питательную среду добавляли после ее автоклавирования с помощью холодной стерилизации, используя фильтры с порами диаметром 0,22 мкм; pH среды регулировали до ее автоклавирования.

После антибиотикотерапии растения-регенеранты пересаживали на модифицированную питательную

среду MS с содержанием 5 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 4 таблетки/л нистатина, pH 5,52.

Поствыживание антибиотикотерапии на дальнейший рост и развитие растений-регенерантов оценивали по следующим показателям: среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.; среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.; доля растений-регенерантов, визуально свободных от бактериальной инфекции, %; доля хорошо развитых растений-регенерантов, %.

*Опыт 2. Влияние различных концентраций 6-БА в модифицированной среде Мурасиге-Скуга на активность процесса геммогенеза растений-регенерантов фундука в условиях in vitro.*

Среды для микроразмножения:

- модифицированная питательная среда MS с содержанием 5 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 4 таблетки нистатина/л (500 000 ЕД), pH 5,52;
- модифицированная питательная среда MS с содержанием 6 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 4 таблетки нистатина/л (500 000 ЕД), pH 5,52;

Культивирование растений-регенерантов проводили в банках объемом 250 мл с объемом среды 40 мл (по 5 растений-регенерантов) и в пробирках объемом среды 7 мл (1 растение в пробирке) на протяжении 7 недель.

*Опыт 3. Влияние различного минерального состава сред и различных видов цитокининов (зеатин и 6-бензилладенин) на активность процесса геммогенеза растений-регенерантов фундука в условиях in vitro.*

Морфогенез растений-регенерантов изучали на следующих средах:

- модифицированная среда MS с содержанием 6-БА и зеатина (ZEATIN, TRANS-isomer, производитель Duchefa Biochemie®) в концентрации 5 мг/л;
- модифицированная среда DKW с содержанием 6-БА и зеатина в концентрации 6 мг/л (табл. 1).

Зеатин добавляли в питательную среду перед автоклавированием.

Растения-регенеранты культивировали по 7 шт. в банках объемом 250 мл с объемом питательной среды 40 мл. Длительность культивирования: 7 и 8 недель (в зависимости от опыта).

*Опыт 4. Влияние желирующих агентов на активность геммогенеза.*

Состав сред с различными желирующими компонентами:

- модифицированная питательная среда DKW с содержанием 6 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 4,4 г/л агар-агара (упругость – 900), 4 таблетки нистатина/л, pH 5,57;
- модифицированная питательная среда DKW с содержанием 6 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,01 мг/л ИМК, 2,2 г/л Gerlite® (производитель Duchefa Biochemie®), 4 таблетки нистатина/л, pH 5,57.

Культивирование растений-регенерантов проводили в банках (250 мл) с объемом среды 40 мл (5 растений-регенерантов в банке) на 13-м пассаже длительностью 7 недель.

Изучаемые показатели на этапе микроразмножения в культуре *in vitro*:

- средняя длина растения-регенеранта, см;
- среднее количество растений-регенерантов, полученных из конгломерата, шт.;

**Таблица 1. Состав питательных сред на этапе микроразмножения**  
**Table 1. Composition of nutrient media for the micropropagation stage**

Обозначение питательной среды	Минеральный состав	Ионы железа	Гормональный состав	Дополнительные компоненты среды
MS 5 мг/л 6-БА	Модифицированная среда MS	200 мг/л FeEDDHA	5 мг/л 6-БА 0,01 мг/л ИМК 0,1 мг/л ГК <sub>3</sub>	4 таблетки нистатина (500 000 ЕД)/л
MS 5 мг/л зеатин			5 мг/л зеатин 0,01 мг/л ИМК 0,1 мг/л ГК <sub>3</sub>	
DKW 6 мг/л 6-БА	6 мг/л 6-БА 0,01 мг/л ИМК 0,1 мг/л ГК <sub>3</sub>			
DKW 6 мг/л зеатин	6 мг/л зеатин 0,01 мг/л ИМК 0,1 мг/л ГК <sub>3</sub>			

– среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.

Условия культивирования: фотопериод – 16/8 ч, температура – 23–25°C, освещение – 3000–3500 лк (лампы OSRAM L36W/765 Cool Daylight).

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, по 7–15 растений в повторности.

Статистическую обработку осуществляли в программе Statistica 10.0. Одно- и двухфакторный анализ проводили с помощью ANOVA, для сравнения средних значений использовали критерий Дункана.

### Результаты и их обсуждение

#### **Антибактериальная терапия растений-регенерантов в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения при однократном воздействии антибиотиков.**

При однократном воздействии антибиотиков в культуре *in vitro* элиминация бактериальной инфекции отмечалась при использовании канамицина моносульфата (доля визуально свободных от инфекции растений-регенерантов составила 83,3%) (табл. 2). На средах с цефотаксима натрия солью визуально свободных от бак-

териальной инфекции растений-регенерантов не наблюдали.

В то же время канамицина моносульфат характеризовался высокой фитотоксичностью, вследствие чего закладка и развитие новых растений в конгломерате были в два раза ниже (1,0 шт.), чем на средах с цефотаксима натрия солью (2,3 шт.) (см. табл. 2). Та же тенденция отмечалась и при росте растений-регенерантов: активность роста растений-регенерантов выше на среде с цефотаксима натрия солью (среднее количество микрочеренков, которые возможно получить при черенковании растений-регенерантов, – 3,7 шт., что в 2,5 раза выше, чем на среде с канамицина моносульфатом).

Оценка дальнейшего развития растений-регенерантов фундука после антибиотикотерапии в культуре *in vitro* позволила достоверно утверждать о поствлиянии антибиотиков на дальнейший рост и развитие растений-регенерантов на средах без антибиотиков (табл. 3).

Растения-регенеранты после сред с антибиотиком канамицина моносульфатом характеризовались снижением активности процессов закладки новых растений и их роста: среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 1,1 шт., и растения были небольшого

**Таблица 2. Влияние однократного воздействия антибиотиков на развитие растений-регенерантов фундука и элиминацию бактериальной инфекции в культуре *in vitro***

**Table 2. The effect of a single exposure to antibiotics on the development of regenerated hazelnut plants and elimination of bacterial infection *in vitro***

Антибиотик для антибиотикотерапии	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.	Доля растений-регенерантов, визуально свободных от бактериальной инфекции, %
	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01
Цефотаксима натрия соль 90 мг/л	2,3a*	3,7a	0b
Канамицина моносульфат 100 мг/л	1,0b	1,5b	83,3a

Примечание: \* – разное буквенное значение в столбцах означает достоверное различие между средними

Note: \* – different letters in the columns indicate a statistically significant difference between the means

**Таблица 3.** Поствлияние однократного воздействия антибиотиков на развитие растений-регенерантов фундука и элиминацию бактериальной инфекции в культуре *in vitro* при культивировании на модифицированной питательной среде MS с 5 мг/л 6-БА

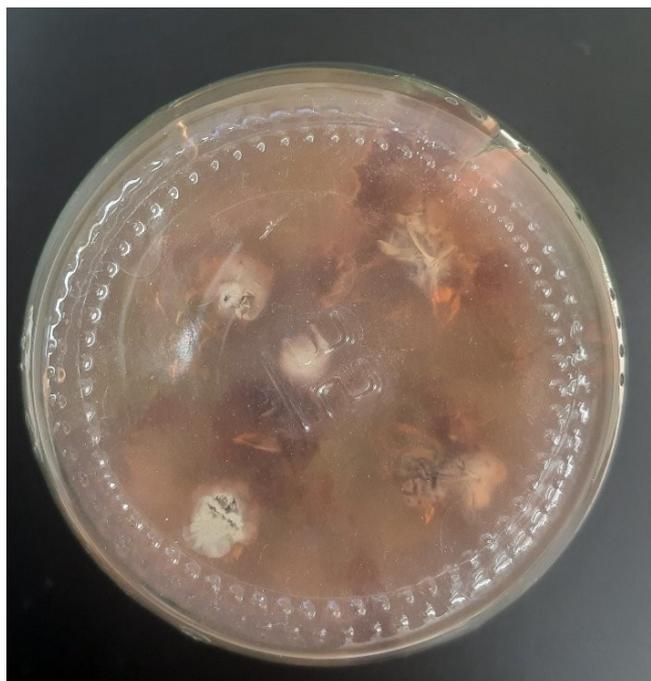
**Table 3.** The aftereffect of a single exposure to antibiotics on the development of regenerated hazelnut plants and elimination of bacterial infection *in vitro* on a modified MS nutrient medium with 5 mg/L 6-BA

Антибиотик для антибиотикотерапии	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.	Доля растений-регенерантов, визуально свободных от бактериальной инфекции, %	Доля некротизированных растений-регенерантов, %	Доля хорошо развитых растений-регенерантов с визуальной инфекцией, %
	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
цефотаксима натрия соль 90 мг/л	1,5a	1,7a	0b	0b	100,0b
канамицина моносульфат 100 мг/л	1,1b	1,1b	77,8a	77,8a	22,2a

размера, вследствие чего микрочеренкование не проводили. Визуально свободными от бактериальной инфекции были 77,8% растений-регенерантов, но они погибли вследствие некротизации. У 22,2% растений-регенерантов стала проявляться скрытая бактериальная инфекция (рис. 1). Однако стоит отметить, что бактериальная инфекция, имеющая вид капсулы у основания растений-регенерантов, не оказывала негативного влияния на их рост и развитие.

Таким образом, антибиотик канамицина моносульфат при однократном воздействии на этапе микрораз-

множения в культуре *in vitro* элиминировал бактериальную инфекцию у 83,3% растений-регенерантов. При дальнейшем культивировании на средах без антибиотика отмечалась его поствлияние в виде высокой фитотоксичности: некроз у 77,8% растений-регенерантов и снижение активности процессов геммогенеза. Цефотаксима натрия соль не элиминировала бактериальную инфекцию; активность геммогенеза и роста растений-регенерантов сохранялись как при антибиотикотерапии, так и при последующем культивировании на средах без антибиотиков.



**Рис. 1.** Бактериальная инфекция в виде капсулы у основания растений-регенерантов

**Fig. 1.** Encapsulated bacterial infection at the base of regenerated hazelnut plants

#### **Антибактериальная терапия растений-регенерантов в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения при двукратном воздействии антибиотиков.**

При двукратном воздействии антибиотиков в культуре *in vitro* эффективность элиминации бактериальной инфекции отмечалась при использовании канамицина моносульфата (доля визуально свободных растений-регенерантов составила 100% сразу после 35 дней антибиотикотерапии) (табл. 4). Данная тенденция сохранялась и после второго этапа терапии.

Цефотаксима натриевая соль не элиминировала бактериальную инфекцию. Рост растений-регенерантов и активность геммогенеза были выше, чем на средах с канамицина моносульфатом: после 81 дня антибиотикотерапии среднее количество растений-регенерантов в конгломерате составило 1,6 шт., в то время как на средах с канамицина моносульфатом процесс геммогенеза не отмечался (см. табл. 4).

Дальнейшее культивирование растений-регенерантов после 81 дня антибиотикотерапии не проводили в силу слабого развития растений в вариантах опыта.

Таким образом, двукратное применение (общее время воздействия антибиотиков – 81 день) канамицина моносульфата в концентрации 100 мг/л в питательной среде на этапе микроразмножения способствовало получению 100% визуально стерильных растений-регенерантов. Однако канамицина моносульфат вызывал к концу терапии некротизацию части растений, и живыми сохранялись только 87,3%. Цефотаксима натриевая соль в концентрации 90 мг/л не элиминировала бактериальную инфекцию; темпы роста и активности геммогенеза

снизились по сравнению с результатами первого этапа воздействия антибиотика (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате составило 1,6 шт., среднее количество микрочеренков – 1,8 шт.).

#### **Влияние различных концентраций 6-БА в модифицированной среде Мурасиге – Скуга на геммогенез растений-регенерантов.**

В ходе анализа результатов отмечалось высокодостоверное влияние концентраций 6-БА на активность процесса геммогенеза ( $p < 0,001$ ) (табл. 5). Однако с практической точки зрения разница в количестве растений-регенерантов в конгломерате на двух средах была незначительна: 1,8 шт. на среде с 5 мг/л 6-БА, 1,9 шт. на среде с 6 мг/л 6-БА.

При культивировании растений-регенерантов фундука в банках среднее количество растений-регенерантов в конгломерате достоверно увеличивалось до 2,1 шт., в то время как в пробирках данный показатель составил 1,7 шт. (рис. 2). Рост растений-регенерантов не определялся емкостью культивирования (см. табл. 5). Лучшие показатели роста отмечались на среде MS 5 мг/л 6-БА в пробирках и на среде MS 6 мг/л 6-БА в банках, на которых среднее количество полученных микрочеренков с конгломерата составило 2,3 шт.

Таким образом, максимальное количество растений-регенерантов фундука отмечалось при культивировании в банках объемом 250 мл на модифицированной питательной среде MS с 6-БА в концентрации 6 мг/л: среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 2,2 шт., среднее количество микрочеренков – 2,3 шт.

**Таблица 4.** Влияние двукратного воздействия антибиотиков на развитие растений-регенерантов фундука и элиминацию бактериальной инфекции в культуре *in vitro*

**Table 4.** The effect of a twofold exposure to antibiotics on the development of regenerated hazelnut plants and elimination of bacterial infection *in vitro*

Длительность антибиотикотерапии	Среда	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.	Доля растений-регенерантов, визуально свободных от бактериальной инфекции, %	Доля жизнеспособных растений-регенерантов, %	Доля растений-регенерантов с каллусом, %
		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Первое воздействие (35 дней)	цефотаксима натриевая соль 90 мг/л	1,9a	2,3a	0	100,0a	0
	канамицина моносульфат 100 мг/л	1,2c	1,3c	100,0a	100,0a	0
Второе воздействие (46 дней)	цефотаксима натриевая соль 90 мг/л	1,6b	1,8b	0	100,0a	100,0a
	канамицина моносульфат 100 мг/л	1,0d	1,0d	100,0a	87,3b	0

**Таблица 5.** Влияние концентраций 6-БА на процесс геммогенеза растений-регенерантов фундука *in vitro*  
**Table 5.** The effect of 6-BA concentrations on the process of gemmogenesis in regenerated hazelnut plants *in vitro*

Питательная среда (фактор А)	Емкость для культивирования (фактор В)	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Среднее количество микрочеренков на конгломерат, шт.
		p < 0,001	p < 0,001
MS 5 мг/л 6-БА	пробирки	1,8с	2,3а
	банки	1,9b	1,9b
MS 6 мг/л 6-БА	пробирки	1,6d	2,0b
	банки	2,2а	2,3а
<b>Питательная среда (фактор А)</b>			
		p <	p <
MS 5 мг/л 6-БА		1,8b	2,1
MS 6 мг/л 6-БА		1,9а	2,2
<b>Емкость для культивирования (фактор В)</b>			
		p <	p <
Пробирки		1,7b	2,1
Банки		2,1а	2,1

Примечание: \* – разное буквенное значение в столбцах означает достоверное различие между средними при p = 0,95  
 Note: \* – different letters in the columns indicate a statistically significant difference between the means at p = 0.95



**Рис. 2.** Растения-регенеранты на модифицированной среде DKW с 6 мг/л 6-БА

**Fig. 2.** Regenerated hazelnut plants on a modified DKW medium with 6 mg/L 6-BA

**Влияние различного минерального состава сред и различных видов цитокининов (зеатин и 6-бензиладенин) на активность процесса геммогенеза растений-регенерантов фундука в условиях *in vitro*.**

Активность геммогенеза растений-регенерантов фундука на модифицированной питательной среде MS с использованием 5 мг/л 6-БА или зеатина достоверно не определялась видом цитокинина (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате на обеих

средах – 1,0–1,05) (табл. 6). Средняя длина растений на среде с 5 мг/л зеатина была в два раза выше, чем на среде с 5 мг/л 6-БА, и составила 2,2 см.

Микрочеренкование растений-регенерантов позволяет увеличить коэффициент размножения. В нашем эксперименте каждый микрочеренок имел минимум две почки. В связи с большим расстоянием между почками у растений-регенерантов, полученных на среде с зеатином, среднее количество микрочеренков достоверно не

**Таблица 6.** Развитие растений-регенерантов фундука на модифицированных питательных средах MS с 6-бензиладенином и зеатином**Table 6.** Development of regenerated hazelnut plants on a modified MS medium with 6-benzyladenine and zeatin

Питательная среда	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Средняя длина растения-регенеранта, см	Среднее количество микрочеренков, полученных из конгломерата, шт.
MS 5 мг/л 6-БА	1,05	1,2b	1,1
MS 5 мг/л зеатина	1,0	2,2a	1,3

отличалось от количества микрочеренков, полученных из конгломератов на среде с 6-БА. В конечном итоге практический выход среднего количества микрочеренков не определялся видом цитокинина и варьировал от 1,1 до 1,3.

Активность геммогенеза растений-регенерантов фундука на модифицированной питательной среде DKW с использованием 6 мг/л 6-БА была выше в два раза по сравнению с растениями-регенерантами, культивируемыми на среде с зеатином (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате на среде с 6-БА – 2,05) (табл. 7).

На среде с зеатином у 29,3% растений-регенерантов почки не трогались в рост, на среде с 6-БА все посаженные растения имели хорошо развитый вид. Кроме того, на среде с зеатином отмечалось корнеобразование: 17,4% растений-регенерантов сформировали по одному корню. На среде с 6-БА корнеобразования не отмечалось (см. табл. 7).

Для улучшения процесса геммогенеза для орехоплодных культур используют различные желирующие аген-

ты (агар-агар, Gerlite®), варьируя их количество, создавая твердую или полужидкую среду. На среде с агар-агаром среднее количество растений-регенерантов сорта 'Академик Яблоков' и среднее количество микрочеренков, полученных из конгломерата, составили 2,5 и 3,3 шт. соответственно, что достоверно выше, чем на среде с использованием желирующего компонента Gerlite® (табл. 8). Однако, несмотря на статистически достоверную разницу, значения данных показателей очень близки и на практике существенного влияния на количество получаемого материала не окажут.

На среде с добавлением Gerlite® средняя длина стебля растений-регенерантов была достоверно ( $p < 0,001$ ) выше на 0,8 см. Однако количество микрочеренков не увеличилось, так как рост отмечался за счет увеличения длины междоузлий, а не за счет активного образования новых почек.

Таким образом, для микроразмножения сорта 'Академик Яблоков' в качестве желирующего компонента целесообразно использовать агар-агар упругостью (силой) 900 в количестве 4,4 г/л.

**Таблица 7.** Развитие растений-регенерантов фундука на модифицированных питательных средах DKW с 6-бензиладенином и зеатином**Table 7.** Development of regenerated hazelnut plants on a modified DKW medium with 6-benzyladenine and zeatin

Питательная среда	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Среднее количество микрочеренков, полученных из конгломерата, шт.	Доля развивающихся растений-регенерантов, %	Доля растений-регенерантов с корневой системой, %
	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
DKW 6 мг/л 6-БА	2,05a	2,9a	100,0a	0,0b
DKW 6 мг/л зеатина	1,0b	1,9b	70,7b	17,4a

**Таблица 8.** Показатели этапа микроразмножения при использовании агар-агара и Gerlite®**Table 8.** Development of regenerated hazelnut plants with agar-agar and Gerlite® in the nutrient medium

Вид желирующего агента	Среднее количество растений-регенерантов в конгломерате, шт.	Средняя длина растений-регенерантов, см	Среднее количество микрочеренков, шт.
	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Агар-агар	2,5a	3,8b	3,3a
Gerlite®	2,3b	4,6a	3,1b

### Заключение

Антибиотик канамицина моносульфат в концентрации 100 мг/л при однократном воздействии на этапе микроразмножения в культуре *in vitro* элиминировал бактериальную инфекцию у 83,3% растений-регенерантов. При дальнейшем культивировании на средах без антибиотиков отмечалось фитотоксичное поствливание канамицина моносульфата, вызывающее некроз у 77,8% растений-регенерантов и снижение активности процессов геммогенеза и роста. Цефотаксима натриевая соль в концентрации 90 мг/л не элиминировала бактериальную инфекцию, но активность геммогенеза и рост растений-регенерантов сохранялись при последующем культивировании на средах без антибиотиков.

Двукратное применение (общей длительностью воздействия 81 день) канамицина моносульфата в концентрации 100 мг/л в питательной среде на этапе микроразмножения способствовало получению 100% визуально стерильных растений-регенерантов. Однако данный антибиотик вызывал к концу терапии некротизацию растений, и жизнеспособность сохраняли только 87,3%. Цефотаксима натриевая соль в концентрации 90 мг/л не элиминировала бактериальную инфекцию. Низкий темп роста и активность геммогенеза сохранялись (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате составило 1,6 шт., среднее количество микрочеренков – 1,8 шт.).

Максимальное количество растений-регенерантов фундука получено при их культивировании в банках объемом 250 мл с объемом среды 40 мл (модифицированная питательная среда Мурасиге – Скуга с 6-БА в концентрации 6 мг/л): среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 2,2 шт., среднее количество микрочеренков – 2,3 шт.

Максимальная активность геммогенеза (среднее количество растений-регенерантов в конгломерате – 2,05 шт., среднее количество микрочеренков – 2,9 шт.) у фундука отмечалась на питательной среде с модифицированным минеральным составом DKW и гормональным составом 6 мг/л 6-БА, 0,01 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>. Использование зеатина в качестве цитокинина для стимуляции адвентивного морфогенеза или активации роста пазушных меристем в концентрации 5 и 6 мг/л малоэффективно по сравнению с 6-БА.

В качестве желирующего компонента питательной среды целесообразно использовать агар-агар упругостью (силой) 900 в количестве 4,4 г/л.

### References / Литература

- Boxus Ph., Terzi J.M. Control of accidental contaminations during mass propagation. *Acta Horticulture*. 1988;225:189-191. DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.225.21
- Dunaeva S.E., Osledkin Yu.S. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role (review). *Agricultural Biology*. 2015;50(1):3-15. [in Russian] [Дунаева С.Е., Оследкин Ю.С. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2015;50(1):3-15]. DOI: 10.15389/agrobiol.2015.13rus
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. Schemes for the production of healthy plants for planting: Certification scheme for hazelnut. *EPPO Bulletin*. 2004;34(2):149-153. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2004.00712.x
- Leifert C., Camotta H., Wright S.M., Waites B., Cheyne V.A., Waites W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 1991;71(4):307-330. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb03795
- MERCK. Plant Tissue Culture. Antibiotics in Plant Tissue Culture Protocol. [website]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/by/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/plant-tissue-culture/antibiotics> [accessed May 21, 2024].
- Orlikowska T., Nowak K., Reed B.M. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2017;128(3):1-22. DOI: 10.1007/s11240-016-1144-9
- Pincelli-Souza R.P., Sousa Moreira L., Cohen D.J. Improvements for the micropropagation of hybrid hazelnut (*C. americana* × *C. avellana*). *Horticulturae*. 2022;8(9):849. DOI: 10.3390/horticulturae8090849
- Rakhmangulov R.S., Urazbakhtina N.A., Simonyan T.A., Matkiv A.O., Tsaturyan G.A. Influence of fungicides on the introduction of hazelnut shoots *in vitro*. *New Technologies*. 2019;4(50):191-199. [in Russian] [Рахмангулов Р.С., Уразбахтина Н.А., Симонян Т.А., Мацькив А.О., Цатурян Г.А. Влияние фунгицидных препаратов на введение побегов фундука в условия *in vitro*. *Новые технологии*. 2019;4(50):191-199]. DOI: 10.24411/2072-0920-2019-10419
- Reed B.M., Mentzer J., Tanprasert P., Yu X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1998;52(1):67-70. DOI: 10.1023/A:1005989000408
- Seitmamutova E.S., Fedorov V.V., Gavrilenko I.V., Matyash Yu.S., Gavrilenko A.V., Shanin D.A. et al. Development and optimization of the method of clonal micropropagation of garden forms of hazelnuts (*Corylus* sp.). *Plant Biology and Horticulture: Theory, Innovation*. 2021;(161):36-46. [in Russian] [Сеитмамутова Э.С., Федоров В.В., Гавриленко И.В., Матяш Ю.С., Гавриленко А.В., Шанин Д.А. и др. Разработка и оптимизация метода клонового микроразмножения садовых форм фундука (*Corylus* sp.). *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2021;(161):36-46]. DOI: 10.36305/2712-7788-2021-4-161-36-46
- Silvestri C., Rugini E., Cristofori V. The effect of CuSO<sub>4</sub> 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*. 2019;154(1):17-23. DOI: 10.1080/11263504.2018.1549610
- Thomas P., Prabhakara B.S., Pitchaimuthu M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7–10 year period *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;85(3):317-329. DOI: 10.1007/s11240-006-9083-5
- Yahyaoui E., Marioni D.T., Botta R., Ruffa P., Germana M.A. Is it possible to produce certified hazelnut plant material in Sicily? Identification and recovery of Nebrodi genetic resources, *in vitro* establishment, and innovative sanitation technique from *Apple Mosaic Virus*. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:778142. DOI: 10.3389/fpls.2021.778142

***Информация об авторе***

**Татьяна Анатольевна Красинская**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, доцент, Институт плодородства, 223013 Беларусь, Самохваловичи, ул. Ковалева, 2, tatsiana.krasinskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9304-420X>

***Information about the author***

**Tatsiana A. Krasinskaya**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Associate Professor, Institute for Fruit Growing, 2 Kovalava St., Samokhvalovichy 223013, Belarus, tatsiana.krasinskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9304-420X>

Статья поступила в редакцию 29.09.2023; одобрена после рецензирования 27.05.2024; принята к публикации 04.09.2024.  
The article was submitted on 29.09.2023; approved after reviewing on 27.05.2024; accepted for publication on 04.09.2024.