

Работа по сохранению краснокнижного лесного ореха методами микроклонального размножения и криосохранения на территории Казахстана

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Лещина обыкновенная (*Corylus avellana*) — вид лесного ореха, находящийся под угрозой вымирания. Его значимость для экосистем, а также пищевая и экономическая ценность делают задачу его сохранения и восстановления чрезвычайно актуальной. Лещина и его культурные формы — фундуки принадлежат к числу наиболее ценных орехоплодных культур [1]. Из-за красивой и прочной древесины это растение было вырублено и сохранилось лишь в труднодоступных горных ущельях Закавказья, поэтому было занесено в Красную книгу СССР [2]. Поэтому использование строгих экспериментальных подходов для подтверждения гипотез о влиянии состава питательной среды на размножение и рост лещины обыкновенной имеет большое значение в области биотехнологии растений.

В условиях изменяющегося климата и деградации природных экосистем традиционные методы размножения не обеспечивают достаточного объема посадочного материала для восстановления популяций. Микроклональное размножение позволяет получать большое количество жизнеспособных растений, что значительно ускоряет процесс восстановления. В данном исследовании акцент сделан на изменении состава питательной среды для эффективного размножения и укоренения лещины обыкновенной.

В научной литературе микроклональное размножение лещины для получения вегетативного потомства имеет ограниченные данные [3]. В тоже время методы биотехнологии весьма успешно используются в целях сохранения и воспроизводства представителей многих видов растений [4]. Преимущества микроразмножения заключаются в том, что оно может проводиться круглый год; позволяет сохранять клоновые признаки; прекрасно сочетается с другими биотехнологическими исследованиями; обеспечивает ограничение болезней. При этом используемые микропобеги удобны для распространения; а растения-регенеранты соответствуют карантинным ограничениям [5–14]. Размножение лещины в условиях *in vitro* впервые было получено из эмбрионов [15].

Лещина, как правило, сложно вводится в культуру из-за того, что в ней присутствуют внутренние микробные загрязнения и отсутствует жизнеспособность эксплантов, при этом бактериальное загрязнение возрастает с дистанцией от верхушки побега. На практике учеными выявлено, что наилучшая процедура при сборе незараженных, жизнеспособных эксплантов — это сбор первых трех узлов активно растущих тепличных растений [16].

Цель исследования: использование методов микроклонального размножения лещины обыкновенной для получения высококачественных и жизнеспособных саженцев.

Область исследования: биотехнологические методы для восстановления популяций редких видов растений.

Предмет исследования: микроклональное размножение и укоренение лещины обыкновенной в условиях *in vitro*.

Методы исследования: подготовка и стерилизация образцов растений. Оптимизация питательной среды. Микроклональное размножение. Укоренение и адаптация. Посадка и выращивание растений. SWOT анализ.

Задачи исследования:

1. Оптимизация условий выращивания лещины обыкновенной.
2. Подготовка и стерилизация растительного материала, обеспечивающего высокое качество полученных растений.
3. Разработка состава питательной среды с включением РРМ для обеспечения развития и адаптации растения.
4. Укоренение и адаптация саженцев в условиях теплицы перед их высадкой в естественную среду.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о биологических процессах размножения растений.

Практическая значимость работы включает возможность применения разработанных методов для массового производства саженцев и восстановления популяций лещины обыкновенной в естественных условиях.

Апробация работы проводилась в лаборатории криосохранения гермоплазмы Института Биологии и Биотехнологии Растений (ИББР), который входит в состав Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика лещины обыкновенной (*Corylus avellana*)

Лещина (орешник) совместно с его культурными формами – фундуками принадлежат к числу наиболее ценных плодовых культур. В народном хозяйстве плоды лещины и фундуков по своему значению находятся близко к грецкому ореху. Плоды фундука являются ценными продуктами питания, так как имеют высокую калорийность и великолепный вкус. Также плоды имеют сбалансированное содержание питательных веществ (белки составляют 15–20 %, жиры 60–75 %, углеводы 3–5 %), обширный набор витаминов (В1, В2, С, Е, РР), солей железа, каротина и других минеральных веществ [1, 17, 18].

Из ценной высокопрочной древесины изготавливают мебель, обручи на бочки, рукоятки, трости, корзины, плетни и другие изделия. Листья, кора и плюска ореха содержат до 13 % таннидов, используемых при выработке

кожевенного сырья. Скорлупа орехов содержит 10–15 % фурфурола – ценного сырья, используемого в лакокрасочной, пластмассовой и других отраслях промышленности. Кроме того, скорлупу орехов используют при изготовлении активированного угля, шлифовальных камней, линолеума, фанеры, брикета [1, 19]. В корневой системе орешника имеются в большом количестве поверхностно расположенные, длинные, очень мощные корневые разветвления, что позволяет сделать его хорошей почвозакрепляющей породой. Орешник широко применяется при создании полезного разведения, лесных посадках и озеленения [17-23].

Род *Corylus* – это представитель семейства *Betulaceae* с 13-15 видами, которые дают съедобные орехи, и диплоиден ($2n = 2x = 22$ хромосомы). Лещина — это однодомное растение, имеющее на одном дереве отдельные мужские цветки (сережки) и женские цветки, формирующие пестичный цветочный кластер. Растения *Corylus* не могут проводить самоопыление, поэтому им необходимо перекрестное опыление для получения орехов [24].

Лещина обыкновенная – это кустарник, размножающийся посредством корневищ и иногда отводков, порослей и зеленых черенков. Лещину отличают от других растений крупный зародыш и мясистые семядоли, покрытые тонкой кожурой [25]. Лещину древовидную внесли в Красные книги Российской Федерации, Северной Осетии – Алании, Краснодарского края и Дагестана [4].

1.2 Процедурные опции для стерилизации эксплантов лещины

В литературе описываются многие процедурные опции для поверхностной стерилизации эксплантов лещины. В частности, поверхностная стерилизация начинается с промывания веточных черенков с помощью антибактериального мыла и споласкивания водопроводной водой в течение 30 минут после удаления листьев. Зачастую ветви разрезаются на одноузловые сегменты и погружаются в 10-20%-ный хлорный отбеливатель (6 % активного хлора) с добавлением нескольких капель поверхностно-активного вещества (Tween-20) и встряхивания 10-30 минут. После указанных процедур сегменты споласкивают 2-3 раза стерильной водой.

Также перед процессом стерилизации отбеливателем иногда производят погружение образцов в 70-95%-ный этанол от 30 секунд до 5 минут. При этом этанол, снижая зараженность, может привести к повышению образования фенольных смол и побурению почек фундука. Для стерилизации также используют другие химические препараты [26–30]. L. Vacchetta [et al.] в своих исследованиях показал, что 0,05 % Na-мертиолат (10 минут) показал большую эффективность, чем хлористый отбеливатель при стерилизации эксплантов фундука [26].

L. Vacchetta [et al.] при введении культуры *Corylus avellana* применяли одноузловые экспланты побегов. Экспланты побегов промывались с помощью водопроводной воды (1 ч), очищались посредством

дезинфицирующего средства, антибактериального мыла (Lysoform Medical, Lever Faberge, Italy) и затем снова споласкивались водопроводной водой. Стерилизация осуществлялась при погружении в 70%-ный этанол на 5 секунд. Затем они, удалив базальные концы, поверхностно стерилизовали экспланты 0,05%-ным Na мертиолатом ($\text{C}_5\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$ Carlo Erba) в течение 10 минут, добавив немного капель Tween-20 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Далее экспланты ополаскивались с помощью стерильной, дистиллированной водой три раза (5 секунд каждый раз). Для эксплантов, собранных зимой, авторы использовали гипохлорит натрия (1:5 v/v) в течение 10 минут и несколько капель Tween-20. Для облегчения абсорбции питательных веществ было осуществлено обновление базальных концов всех эксплантов перед тем, как поместить их на культуральную среду [26].

Стерилизация зеленых побегов З. М. Алиевой и др. производилась в несколько этапов. Авторами предварительно побеги замачивались мыльной водой 10-15 минут при добавлении 2-3 капель Tween - 80, далее промывались несколько раз с помощью водопроводной воды и 2-3 раза – с помощью дистиллированной воды. Зеленые побеги разрезались на небольшие части, срезы парафинировались, чтобы предотвратить попадание в ткани стерилизующих компонентов. Далее осуществлялась стерилизация (8 минут в 0,1%-ном растворе сулемы). Затем экспланты побегов промывались с помощью дистиллированной воды в течение 5, 10 и 15 минут. Экспланты помещались на питательную среду Мурасиге-Скуга при разном соотношении регуляторов роста, имеющих цитокининовую и ауксиновую природу (ИМК, БАП, ГК) [31].

1.3 Преимущества микрклонального размножения растений по сравнению с традиционными методами размножения

Одним из основных препятствий для внедрения новых сортов растений в практику является отсутствие возможности получения большого количества семян или посадочного материала для вегетативного размножения. Однако с помощью биотехнологии селекционерам предлагается эффективный и быстрый метод микроразмножения растений. Исследования процесса экспериментального морфогенеза *in vitro* на всех уровнях организации привели к созданию технологии микрклонального микроразмножения растений, который уже широко используется в коммерческих целях во многих странах.

Микрклональное размножение — это процесс массового бесполого размножения растений в специальных условиях, при котором полученные растения генетически идентичны исходному растению. Этот метод размножения позволяет получить посадочный материал, который полностью совпадает с исходным растением, поскольку возникает из клеток самого растения. В отличие от полового размножения, при котором

потомство получает гены от обоих родителей, микрклональное размножение обеспечивает идентичность генетического материала.

Преимущества клонирования растений по сравнению с традиционными методами включают в себя получение генетически однородного материала, защиту растений от различных болезней и инфекций, возможность быстрого размножения в больших количествах, ускорение процесса селекции, возможность размножения растений, которые трудно размножать обычными методами, и экономию площади для выращивания материала.

Технологии размножения *in vitro* можно поделить на две категории: мелкомасштабные и крупномасштабные в зависимости от объема производства. Это разделение обусловлено различными целями и областями применения.

Французский ученый Жорж Морель стал основателем клонального микроразмножения, когда в 1960 году он разработал этот метод для орхидей. Он использовал верхушку цимбидиума в качестве экспланта, из которой при определенных условиях появлялись сферические образования - протокормы. Протокормы можно было делить и культивировать на питательной среде, что приводило к образованию листовых примордиев и корней. Этот процесс оказался бесконечным, позволяя получить высококачественный и генетически однородный посадочный материал без вирусов в большом количестве.

Процесс микроразмножения включает в себя несколько этапов. Сначала проводится отбор подходящих эксплантов, их стерилизация и перенос на питательную среду. Затем происходит сам процесс микроразмножения, который позволяет получить большое количество клонов одного растения. После этого происходит укоренение побегов, а затем адаптация их к условиям почвы. Наконец, растения выращиваются в теплице и готовятся к посадке в поле [32].

1.4 Химический состав питательной среды на разных этапах микрклонального размножения растений

Химический состав и физические свойства питательной среды должны быть оптимально подобраны для успешного процесса микроразмножения. Каждый этап размножения требует своих условий, поэтому среда должна быть соответственно настроена.

Процесс микрклонального размножения растений начинается с отбора стерильных эксплантов, которые затем вводятся в культуру. Этот этап является наиболее затратным и требует больших усилий, так как производительность невелика, а потери могут быть значительными. Лаборатории, планирующие производить миллионы растений в год, должны начать с не менее чем 2000 стерильных эксплантов. Однако главная задача первого этапа - получить не только стерильные экспланты, но и способные к дальнейшему росту.

Культура изолированных органов и тканей растений изначально использовалась для исследований в физиологии растений. Большинство исследователей ставили перед собой задачу длительного роста эксплантов, поэтому используемые среды способствовали развитию каллуса. Водный потенциал питательных сред в культуре примерно в 10 раз ниже, чем в почвенном растворе при нормальной увлажненности, что необходимо для выращивания растений *in vitro*, но может привести к образованию стекловидных образований.

Для успешного размножения растений в условиях *in vitro* необходимо тщательно подбирать состав питательных сред, учитывая множество факторов, влияющих на рост и развитие эксплантов. Это необходимо, так как среды, разработанные для определенных условий, могут быть неэффективны для других. Условия выращивания могут влиять на обмен веществ и синтезирование добавляемых компонентов в среду.

Вопрос о составе макро- и микроэлементов в питательных средах для микроклонального размножения является мало изученным. Большинство работ проводится на основе минерального состава таких сред, как Мурасига и Скуга, Уайта, Хеллера, Нича, раствора Кноп. Выбор состава питательной среды усложнен различиями в поведении эксплантов на разных стадиях размножения и их физиологическом состоянии. Для каждого сорта растения необходимо подбирать индивидуальную оптимальную среду. Многие процессы роста и развития растений и их органов требуют участия физиологически активных веществ.

Один из основных аргументов в пользу возможного интенсивного размножения растений *in vitro* заключается в том, что физиологические процессы у эксплантов происходят при строго контролируемых оптимальных условиях. Мы можем устанавливать необходимые параметры температуры, освещения, влажности и состава питательной среды. Однако следует заметить, что экспланты, отделенные от родительского растения и подвергнутые стерилизации, находятся в состоянии стресса, которое усиливается изменениями в газовом составе и составе питательной среды в процессе выращивания. Если к этому добавляется неоптимальный состав среды и условия выращивания, то в процессе размножения могут возникнуть анатомо-физиологические нарушения, которые негативно повлияют на эффективность микроклонального размножения [33].

Наибольший вред создают стекловидность, некроз верхушек, отсутствие кутикулярного слоя, нефункциональные устьица и неработающая корневая система. У некоторых растений признаки стекловидности проявляются уже на начальных этапах размножения, а у других это является редким явлением. Размноженные *in vitro* побеги, имеющие стекловидность, часто не укореняются и могут выживать только в таких условиях. Трудно перенести такие растения в нестерильные условия. Стекловидность связана с нарушением водного потенциала клеток экспланта из-за нарушения процесса транспирации *in vitro*. Различные методы, такие как темнота, антибиотики, антитранспиранты, манитол,

высокие концентрации CO_2 , которые могут закрыть устьица у нормальных растений, не помогают стекловидным растениям. Экспланты *in vitro* часто сталкиваются с недостатком питательных элементов, особенно кальция причиной некроза верхушек побегов в *in vitro* [34].

Все аномальные явления, которые наблюдаются у растений в *in vitro*, связаны с изменениями содержания и активности эндогенных гормонов. Отклонения в структуре листьев и побегов могут быть результатом нарушения перемещения ауксина, вызванного интенсивным синтезом этана. Для размножения растений в индивидуальных условиях необходимо вводить в питательную среду цитокины и ауксины, однако эти регуляторы роста стимулируют синтез этана, что в свою очередь вызывает появление аномальных процессов. Важно поддерживать оптимальное соотношение экзогенных регуляторов роста в питательной среде для успешного применения микроклонального размножения.

Промышленное использование данного метода возможно лишь при успешном выведении растений из индивидуальных условий в нестерильные. Из-за физиологических нарушений растения в нестерильных условиях подвержены водному стрессу, что может привести к задержке роста или гибели [35].

Проблема водного стресса усугубляется невозможностью водных растений проводить фотосинтез при отсутствии достаточного доступа к воде. Еще одной проблемой при переносе растений в нестерильные условия является недостаточно развитая корневая система. Корни растений, выращенные *in vitro*, имеют специфическое строение, их сосуды не всегда связаны с сосудами побегов, а также отсутствуют корневые волоски [36]. Поэтому растения, которые переносятся в новые условия, должны либо адаптировать свои старые части, либо вырастить новые достаточно быстро. Желательно, чтобы эти процессы происходили одновременно.

1.5 Выращивание и укоренение саженцев

Высокую частоту укоренения специалисты получали двумя способами: *in vitro* с использованием среды с 4,9 мкМ ИМК и *ex vitro*, при погружении в 1 или 5 мМ раствор ИМК на 1 минуту. При использовании укоренения *ex vitro* осуществили ускорение переноса растений из ростовой комнаты в теплицу в коммерческих питомниках. Во время акклиматизации в 78–100 % достигли выживания растения, выращенные в смеси 1 vermiculite: 1 perlite в тумане за 2–3 недели, затем они были перенесены на столы теплицы [27].

Для укоренения побегов в исследовании L. Vacchetta [et al.] базальные концы побегов погружали в раствор ИМК (1 мг/л) на 20 секунд, а затем культивировали на НМ-среде без гормонов в течение 20 дней. После этого побеги были перенесены на среду НМ с 1/3 концентрации минеральных солей и добавлением ИМК (2 мг/л) и культивировали еще 1 месяц [26].

Статья M.N. Nas, P.E. Read свидетельствует о том, что четыре генотипа фундука, которые были культивированы *in vitro* на среде Nas and Read (NRM) на специальной среде с содержанием различных комбинаций $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и миоинозитола, успешно укоренились и адаптировались *ex vitro*. Основания побегов погружались в 1000 ppm ИМК-раствор на 5 или 10 секунд, затем высаживались на NRM, которая не содержала регуляторы роста. Такие действия привели к тому, что корни образовались через 8 дней. Побеги, которые обработали в течение 5 или 10 секунд, укоренялись аналогично. Различные генотипы фундука от 88 % до 98 % укоренялись через 15 дней после обработки ИМК. Побеги выживали *ex vitro* через три месяца после индукции корней *in vitro* в 73 % случаев после 5 секунд обработки ИМК и 66 % после 10 секунд обработки. Наибольшее выживание *ex vitro* (97 %) наблюдалось, когда побеги обрабатывали ИМК-раствором в течение 10 секунд и культивировали непосредственно в торфяных дисках [30].

Для того чтобы увеличить длительность беспересадочного хранения пробирочных растений повышают их устойчивость к холоду. Для этого нужно проводить закаливание пробирочных растений. Этот эффект достигается воздействием на них ежедневно вначале положительной, а затем отрицательной температурами (+22 °C 8 часов на свету / -1 °C 16 часов в темноте) в течение одной недели. Такие действия дают хорошие результаты во время последующего хранения *in vitro* коллекций *Ribes*, *Fragaria*, *Rubus*, *Corylus*, *Pyrus*, *Vaccinium* [38].

Таким образом, выращивание и укоренение саженцев — это важный этап в разведении растений и создании сада или огорода. Этот процесс включает в себя несколько шагов, которые помогут обеспечить хорошее развитие растения и его успешное укоренение. Для укоренения саженцев можно также использовать ряд методов, таких как погружение корневой системы в стимуляторы роста, создание тепличных условий для роста или использование растительных гормонов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудашева, Р.Ф. Разведение и селекция лещины и фундука / Р.Ф. Кудашева. – М.: Лесная промышленность, 1963. – 117 с.
2. В. Артамонов. «Полезное и красивое растение - лещина обыкновенная - находится на грани вымирания». «Наука и жизнь», 1989, №10. – С. 158-161.
3. Алиханова, А.А. Использование семядолей для микроклонального размножения лещины (*Corylus avellana* L.) / А.А. Алиханова, А.Г. Юсуфов // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: тез. докл. IX Междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г. / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова; редкол.: А.В. Носов [и др.]. – М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С.16–17.
4. Алиева, З.М. Введение в культуру *in vitro* березы радде и лещины древовидной / З.М. Алиева, В.К. Магомедалиева // VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международная научная школа «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции», Нижний Новгород, 4-10 июля 2011 г. / ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2011. – С. 43–44.
5. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
6. Верзилин, А.В. Использование биотехнологии для усовершенствования селекционного процесса клоновых подвоев яблони с целью его ускорения / А.В. Верзилин, Д.В. Иванов, Ю.В. Трунов // Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем: сб. докл. и сообщ. XVIII Мичур. чтений, Мичуринск, 27-29 окт. 1997 г. / Всерос. науч.-исслед. ин-т генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина; редкол.: Н.И. Савельев (гл. ред.) [и др.]. – Мичуринск, 1998. – С. 63–64.
7. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников / В.А. Высоцкий // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: сб. науч. тр. / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т садоводства им. И.В. Мичурина; гл. ред. Е.П. Куминов. – Мичуринск, 1989. – С. 3–8.
8. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.
9. Колбанова, Е.В. Микроразмножение и оздоровление от сокопереносимых вирусов смородины черной в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23; 06.01.11 / Е.В. Колбанова; Нац. акад. наук Беларуси, ГНУ «Ин-т микробиологии». – Минск, 2003. – 20 с.
10. Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro*: отчет о НИР (заключ.) / С.Э. Семенас, Н.В. Кухарчик, А.А. Змушко. – Самохваловичи, 2005. – 19 с.

11. Попов, Ю.Г. Культура стеблевых верхушек *in vitro* как метод ускоренного размножения плодовых и ягодных растений / Ю.Г. Попов, В.А. Высоцкий // Вестн. с.-х. науки. – 1978. – № 4. – С. 124–127.
12. Quamme, H.A. Early performance of micropropagated trees of several *Malus* and *Prunus* cultivars on their own roots / H.A. Quamme, R.T. Brownlee // *Canad. J. Plant Science*. – 1993. – Vol. 73, № 3. – P. 847–855.
13. Джигадло, М.И. Использование биотехнологических и биофизических методов в селекции и сортотразведении плодовых и ягодных культур: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / М.И. Джигадло; Мичур. гос. аграр. ун-т. – Мичуринск, 2003. – 26 с.
14. Кухарчик, Н.В. Культура *in vitro* в размножении и оздоровлении плодовых и ягодных растений / Н.В. Кухарчик, С.Э. Семенас, Е.В. Колбанова // Актуальные проблемы освоения достижений науки в промышленном плодоводстве: материалы междунар. науч.-практ. конф., пос. Самохваловичи, 21-22 авг. 2002 г. / Белорус. науч.-исслед. ин-т плодоводства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2002. – С. 107–113.
15. Radojevic, N. Embryogenesis in tissue culture of *Corylus avellana* L. / N. Radojevic, R. Vujicic and M. Nesrovic // *Z Pflanzenphysiol Bd*. – 1975. – № 77. – P. 33–41.
16. Hand, Ch. R. Improving Initiation and Mineral Nutrition for Hazelnut (*Corylus avellana*) Micropropagation / Charles R. Hand // A THESIS submitted to Oregon State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. – Presented April 18, 2013. – Commencement June 2013. – 123 p. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/38565/HandCharlesR2013.pdf?sequence=1>. – Date of access: 22.04.2015.
17. Горшкова, Т.А. Лещина / Т.А. Горшкова. – М.: Сельхозгиз, 1953. – 124 с.
18. Махно, В.Г. Биохимический состав ореха фундука при хранении в естественных условиях / В.Г. Махно, В.Н. Бехтерев, А.М. Кожевникова // Садоводство и виноградарство. – 2013. – № 4. – С. 32–43.
19. Горшкова, Т.А. Лещина / Т.А. Горшкова. – М.: Сельхозгиз, 1953. – 124 с.
20. Волович, П.И. Распространение и разнообразие культурных форм лещины в Беларуси / П.И. Волович, П.И. Хрипач // Теплолюбивые культуры (виноград, орех грецкий, абрикос, персик и др.) в северных районах садоводства: материалы междунар. науч. совещ., Пинск, 3-5 сент. 1998 г. / БелНИИП; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 1998. – С. 43–45.
21. Лесоведение и лесное хозяйство: респ. межвед. сб. / Белорус. технол. ин-т им. С.М. Кирова; редкол.: А.Д. Янушко (гл. ред.) [и др.]. – Мн.: Вышэйшая школа, 1974. – Вып. 8. – 158 с.
22. Кичунов, Н.И. Орехи и их культура / Н.И. Кичунов // Департамент земледелия. – СПб.: Типография П.П. Сойкина, 1905. – С. 9–64.

23. Промышленное выращивание фундука // Ассоциация питомников России [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://asprus.ru/blog/promyshlennoevyrashhivanie-funduka>. – Дата доступа: 04.09.2014.
24. Thompson, M.M. Hazelnuts / M.M. Thompson, H.B. Lagerstedt and S. Mehlenbacher // *Fruit breeding*. – 1996. – P. 125–147.
25. Алиханова, А.А. Естественное вегетативное возобновление лещины обыкновенной и потенции к регенерации ее изолированных структур: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / А.А. Алиханова; Российский гос. аграр. ун-т. – Москва, 2009. – 144 с.
26. In Vitro Propagation of Traditional Italian Hazelnut Cultivars as a Tool for the Valorization and Conservation of Local Genetic Resources / L. Bacchetta [et al.] // *Hortscience*. – 2008. – № 43(2). – P. 562–566.
27. Yu, X. A Micropropagation System for Hazelnuts (*Corylus Species*) / X. Yu, B.M. Reed // *Hortscience*. – 1995. – № 30(1). – P. 120–123.
28. Messeguer, J. Clonal propagation of *Corylus avellana* L. "in vitro" / J. Messeguer and E. Mele // *Proceedings: Atti del Convegno Internatazionale sul Nocciuolo*. – Avellino, Italia, 1983. – P. 293–295.
29. Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana* / N. Bassil [et al.] // *Acta Hort*. – 1992. – № 300. – P. 137–140.
30. Nas, M.N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation / M.N. Nas // *Turk. J. Agric. For.* – 2004. – № 28. – P. 189–194.
31. Алиева, З.М. Специфика морфогенеза изолированных структур редких растений Дагестана in vitro / З.М. Алиева, В.К. Мартемьянова, А.Г. Юсуфов // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – Вып. 6-1. – С. 58–62.
32. Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
33. В.И. Деменко. Проблемы и возможности микроклонального размножения садовых растений. Введение в культуру. Известия ТСХА. выпуск 2. 2005 год. – С. 48-58.
34. Boxus Ph. et al. *Plant Cell. Tissue and Organ Cult.* Berlin (West), 1977.
35. David W. et al. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1989. V. 17. № 3. P. 225-234.
36. Gront B. W. *Acta Horticulture*, 1988. № 230. P. 129-135.
37. Дунаева, С.Е. Коллекции плодовых и ягодных культур in vitro (стратегия создания и хранение) / С.Е. Дунаева, Т.А. Гавриленко // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. – 2007. – Т. 161. – С. 10–19.
38. Midyear report to the Oregon Department of Agriculture (ODA) / Oregon Association of Nurserymen (OAN). November, 2014. Project Title: Improved Mineral Nutrition for Hazelnut Micropropagation [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.oregon.gov/ODA/shared/Documents/Publications/NurseryChristmasTree/NurseryResearchHazelnut_Prof.pdf. – Date of access: 13.04.2015.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Глоссарий:

Глоссарий для проекта по сохранению лесного ореха методами микроклонального размножения и криосохранения:

1. Адаптация - процесс приспособления организмов к новым условиям окружающей среды.
2. Антибактериальное мыло - средство, использующееся для удаления микроорганизмов с поверхности растений.
3. Ауксины - группа гормонов растений, стимулирующих рост клеток.
4. Биотехнология - использование живых организмов и биологических процессов для создания продуктов и технологий.
5. Вегетативное размножение - процесс размножения растений без участия семян, через корни, побеги или листья.
6. Гипохлорит натрия - химическое соединение, используемое для стерилизации эксплантов.
7. ИМК (индолилмасляная кислота) - растительный гормон, используемый для укоренения растений.
8. Криосохранение - метод сохранения биологического материала при очень низких температурах.
9. Лещина обыкновенная (*Corylus avellana*)- вид лесного ореха, находящийся под угрозой исчезновения.
10. Микроклональное размножение - метод вегетативного размножения растений в лабораторных условиях.
11. Микропобеги - маленькие побеги, используемые в процессах микроклонального размножения.
12. Мурасиге-Скуга (МС) - стандартная питательная среда для культивирования растительных клеток *in vitro*.
13. Натуральные меристемы - ткани растений, состоящие из делящихся клеток, используемые для микроклонального размножения.
14. Питательная среда - смесь химических веществ, обеспечивающая рост и развитие растений *in vitro*.
15. Регуляторы роста - химические вещества, влияющие на рост и развитие растений.
16. Стерилизация - процесс удаления всех микроорганизмов с поверхности растений.
17. Твин-20 (Tween-20) - поверхностно-активное вещество, используемое для стерилизации эксплантов.
18. Укоренение - процесс образования корней у растений.
19. Фенольные смолы - вещества, выделяемые растениями в ответ на повреждения, которые могут усложнять процессы стерилизации.
20. ppm (parts per million)- единица измерения концентрации веществ, часто используется для обозначения очень низких концентраций химических соединений в питательных средах или растворах.

21. DKW (Driver and Kuniyuki Walnut medium) - специализированная питательная среда, разработанная для культивирования орехоплодных культур, таких как грецкий орех