

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***

Рахмангулов Руслан Султанович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной селекции, научный сотрудник отдела биотехнологии

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Россия

E-mail: rakhmaruslan@yandex.ru

Уразбахтина Нурия Анасовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимического анализа и биотехнологий

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», Россия

E-mail: unur1561@rambler.ru

Симонян Таисия Артуровна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной селекции отдела биотехнологии

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Россия

E-mail: taisiya-simony@yandex.ru

Мацькив Александра Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной селекции отдела биотехнологии

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Россия

E-mail: matskiv_a@mail.ru

Цатурян Григорий Агасиевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной селекции отдела биотехнологии

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», Россия

E-mail: grisha.tsaturyan@yandex.ru

*В статье представлены оригинальные данные по разработке способов получения стерильных жизнеспособных эксплантов фундука. Общеизвестно, что одним из сложных этапов клонального микроразмножения древесных культур является этап введения в культуру *in vitro* ввиду сильной контаминации эндогенными грибами, чрезмерной стерилизации и окисления эксплантов. Вследствие чего, целью настоящей работы послужило определение степени влияния различных фунгицидов на рост чистой культуры грибных фитопатогенов в условиях *in vitro*, а также обработки побегов фундука для получения стерильной культуры.*

В результате исследований было установлено, что с предобработкой побегов фунгицидами количество чистых жизнеспособных эксплантов составило 10-44 %, в зависимости от вида фунгицида. В контрольном варианте количество жизнеспособных

эксплантов составило 0 %. Значительные результаты были получены при обработке такими препаратами, как сценик, клад и ламадор, где процент стерильных жизнеспособных эксплантов варьировал в диапазоне 42-44 %.

Данные результаты будут полезны в процессе формирования депонированной коллекции хозяйственно-полезных генотипов фундука в условиях *in vitro* и разработки регламентов клонального микроразмножения. Полученные данные послужат основой для дальнейших исследований.

Ключевые слова: *Corylus avellana*, фундук *in vitro*, фитопатогены, влияние фунгицидов, стерилизация эксплантов, предобработка эксплантов.



Для цитирования: Влияние фунгицидных препаратов на введение побегов фундука в условия *IN VITRO* / Рахмангулов Р.С., Уразбахтина Н.А., Симонян Т.А. [и др.]// Новые технологии. 2019. Вып. 4(50). С. 191-199. DOI: 10.24411/2072-0920-2019-10419.

Rakhmangulov R.S., Urazbakhtina N.A., Simonyan T.A., Matskiv A.O., Tsaturyan G.A.

INFLUENCE OF FUNGICIDES ON THE INTRODUCTION OF HAZELNUT SHOOTS IN *IN VITRO*

Rakhmangulov Ruslan Sultanovich, Candidate of Biology, head of the Laboratory of Molecular and Cellular Selection, a researcher at the Department of Biotechnology FSBSI «All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Russia
E-mail: rakhmaruslan@yandex.ru

Urazbakhtina Nuria Anasovna, Candidate of Biology, a senior researcher, Laboratory of Biochemical Analysis and Biotechnology FSBEI of HE «Bashkir State Agrarian University», Russia
E-mail: unur1561@rambler.ru

Simonyan Taisiya Arturovna, a junior researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Breeding, Department of Biotechnology FSBSI «All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Russia
E-mail: taisya-simony@yandex.ru

Matskiv Alexandra Olegovna, a junior researcher, Laboratory of Molecular and Cell Breeding, Department of Biotechnology FSBSI «All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Russia
E-mail: matskiv_a@mail.ru

Grigory Tsaturyan, a junior researcher, Laboratory of Molecular and Cell Breeding, Biotechnology Department FSBSI «All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Russia
E-mail: grisha.tsaturyan@yandex.ru

The article presents original data on the development of methods for producing sterile viable hazelnut explants. It is well known that one of the difficult stages of clonal micropropagation of tree crops is the stage of introducing in vitro into the culture due to the strong contamination by endogenous fungi, excessive sterilization and oxidation of explants.

As a result, the aim of the work is to determine the degree of influence of various fungicides on the growth of a pure culture of fungal plant pathogens under the invitro condition, as well as processing hazelnut shoots to obtain a sterile culture.

As a result of the studies, it has been found that the number of pure viable explants is 10-44 % with pre-treatment of shoots with fungicides, depending on the type of fungicide. In the control variant, the number of viable explants is 0 %.

Significant results have been obtained when processing with such preparations as Scenic, Klad and Lamador, where the percentage of sterile viable explants varies in the range of 42-44 %. These results will be useful in the process of forming a deposited collection of economically useful hazelnut genotypes under in vitro conditions and developing regulations for clonal micropropagation. The data obtained will serve as the basis for further research.

Key words: *Corylus avellana*, in vitro hazelnut, phytopathogens, the effect of fungicides, explant sterilization, explant pretreatment.

For citation: Rakhmangulov R.S., Urazbakhtina N.A., Simonyan T.A., Matskiv A.O., Tsaturyan G.A. Influence of fungicides on the introduction of hazelnut shoots in *in vitro* // Novye Tehnologii. 2019. Issue. 4(50). P. 191-199. DOI: 10.24411/2072-0920-2019-10419.

Фундук (*Corylus L.*), является одной из самых популярных и значимых мировых орехоплодных культур как в научном, так и промышленном направлении. Основным видом, распространённым в сельском хозяйстве, является *C. avellana L.* – лещина обыкновенная, древовидный кустарник, ареал распространения которого охватывает большую часть Европы от лесов Португалии до предгорий Южного Урала, а также Переднюю Азию от Турции до Кавказа. Кроме *C. avellana*, в происхождении сортов фундука отмечена роль и *C. maxima L.* Сорта фундука в промышленном масштабе выращиваются повсеместно на территориях стран Европы, Кавказа, Северной Америки и на Среднем Востоке. Учитывая большую значимость данной культуры, множество научных учреждений занимаются изучением технологических аспектов выращивания фундука, в том числе и получением качественного посадочного материала [1-4].

Так в отделе биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (ФГБНУ ВНИИЦиСК) ведутся исследования по разработке методики клонального микроразмножения фундука в условиях *in vitro* для последующего получения оздоровленного качественного посадочного материала. Ранее был показан высокий процент контаминации эксплантов ввиду отсутствия предварительной обработки побегов соответствующими фунгицидами [5, 6]. В продолжение проведенных исследований в данной статье представлен ряд опытов с применением других препаратов, проявляющих фунгицидную активность.

Материалы и методы

Первичным материалом послужили экспланты фундука – верхушечные и пазушные почки с вегетирующих побегов. Сбор материала проводился с маточных растений фундука сорта ‘Трапезунд’ коллекции ФГБНУ ВНИИЦиСК. Стерилизацию эксплантов проводили по отработанному ранее регламенту [6]. Далее в течение двух недель отбраковывали инфицированные пробирки. Питательной основой для

культивирования побегов фундука послужила модифицированная минеральная среда по прописи Мурасиге – Скуга (МС), соблюдался следующий режим выращивания: фотопериод – 16/8 час., температура $25\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, влажность – 70 %, освещенность 4000-5000 лк.

Выделение чистой грибной культуры проводилось по общепринятым методикам на базе лаборатории биохимического анализа и биотехнологий ФГБОУ ВО БГАУ из пробирок с зараженными эксплантами фундука с последующим титрованием и посевом на чашки Петри с питательной средой на основе картофельного отвара с добавлением глюкозы и агара.

В качестве опытных препаратов были выбраны следующие препараты, проявляющие фунгицидную активность:

1. Тебу 60, (д.в. тебуконазол, 60 г/л), норма применения 10 мл/л;
2. Сценик Комби (д.в. клотианидин, 250 г/л; протиоконазол, 37,5 г/л; тебуконазол, 5 г/л; флуоксастробин 37,5 г/л), норма применения 10 мл/л;
3. Клад, (д.в. имазалил, 60 г/л; тебуконазол, 60 г/л; тиабендазол, 80 г/л), норма применения 10 мл/л;
4. Ламадор (д.в. тебуконазол, 150 г/л; протиоконазол, 250 г/л), норма применения 10 мл/л);
5. Нистатин (д.в. нистатин, 111.10 мг) 10 мг/л;

В качестве контрастного фона также были выбраны некоторые бактерицидные препараты:

1. Стрептомицин (д.в. стрептомицина сульфат, 500 мг) 10 мг/л;
2. Тетрациклин (д.в. тетрациклина гидрохлорид – 100 мг) 10 мг/л.

Обработку чистых грибных культур препаратами проводили посредством внесения препаратов в лунки в чашках Петри. Показатели фунгицидной активности препаратов фиксировали на 3 сутки.

Обработку побегов опытными препаратами проводили непосредственно перед введением эксплантов в условия *in vitro*. Время экспозиции эксплантов в опытных растворах составляла 24 часа. Последующая стерилизация побегов проводилась по вышеописанной методике.

Лабораторные опыты проводились в 3-кратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартного пакета Microsoft Office, измерение очагов фунгицидной активности (рис. 1) осуществляли с помощью программы ImageJ.

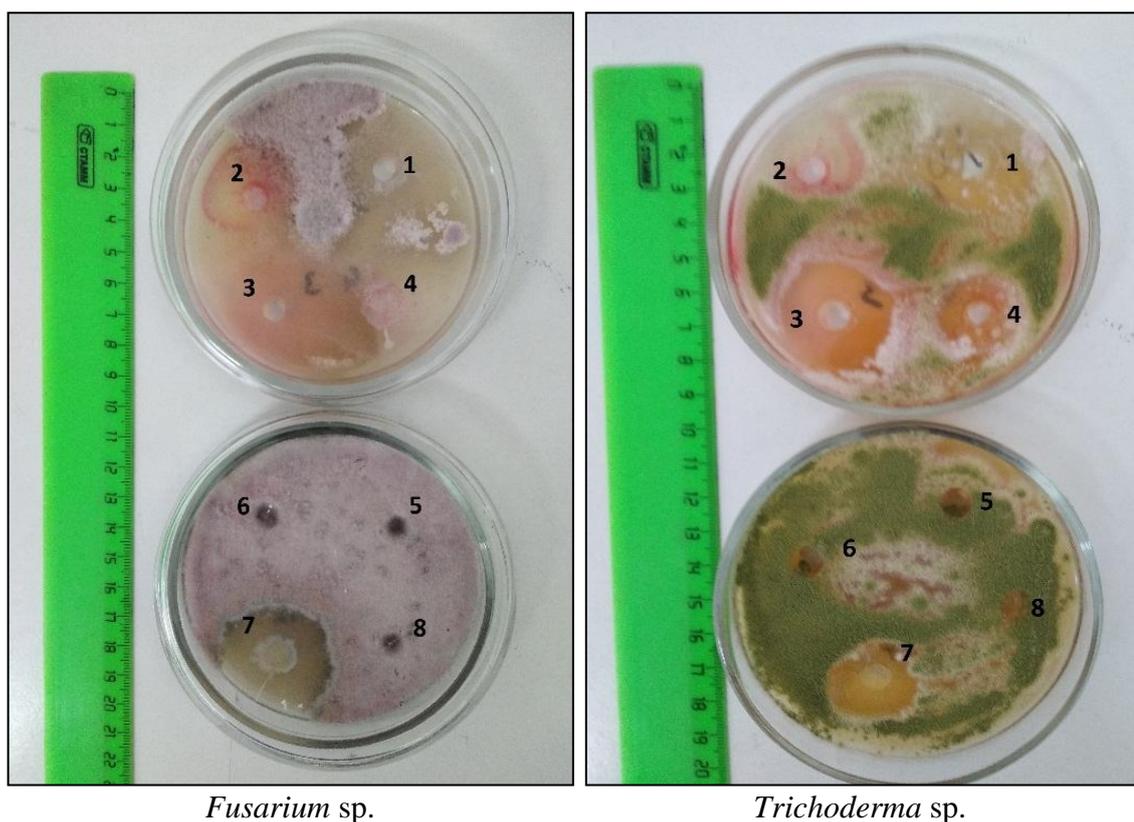


Рис. 1. Влияние фунгицидной активности на рост и развитие грибной микрофлоры

Примечание: 1 – Тебу 60; 2 – Сценник Комби; 3 – Клад; 4 – Ламадор; 5 – Нистатин; 6 – Стрептомицин; 7 – Тетрациклин; 8 – контроль.

Результаты

В результате проведённого опыта установлена фунгицидная активность исследуемых препаратов (табл. 1). Так было отмечено отсутствие влияния тетрациклина и стрептомицина на выделенные из инфицированных эксплантов фундука грибной микрофлоры.

Большинство фунгицидных препаратов показало статистически достоверную фунгицидную активность. Так, наиболее статистически достоверные различия фунгицидной активности на *Aspergillus* sp. установлены между следующими препаратами: Тебу и Клад, где t-критерий Стьюдента составил 5,8 при $p = 0,01$; Ламадор и Клад, где t-критерий Стьюдента составил 4,75 при $p = 0,01$. t-критерий Стьюдента в 4,94, при $p = 0,01$ характерен препаратам Клад и Нистатин при влиянии на *Trichoderma* sp. Для патогенов рода *Trichoderma* sp. достоверные различия наблюдались при $p = 0,05$. Также статистически значимые различия установлены между препаратами Нистатин и Клад для *Penicillium* sp., где t-критерий Стьюдента составил 8,52 при $p = 0,01$. Для рода *Botritis* sp. наилучшую фунгицидную активность проявили такие препараты как Клад и Нистатин со статистически достоверными различиями с другими препаратами.

Таблица 1 - Метрические показатели фунгицидной активности

№ п/п	Вид / Препарат	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Trichoderm</i> a sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Botritis</i> sp.
1	Тебу	*3,32±0,17	3,68±0,18	3,58±0,21	0	1,06±0,05

2	Сценик Комби	4,61±0,26	3,87±0,22	2,88±0,10	2,72±0,20	2,28±0,16
3	Клад	*4,71±0,17	4,18±0,17	3,59±0,19	3,91±0,16	4,02±0,29
4	Ламадор	3,87±0,11	4,46±0,15	2,44±0,16	0	2,54±0,13
5	Стрептомицин	0	0	0	0	0
6	Тетрациклин	0	0	0	0	0
7	Нистатин	3,78±0,29	3,63±0,14	2,59±0,07	1,89±0,17	4,08±0,33
8	Контроль	0	0	0	0	0

Из всех исследованных вариантов предобработки побегов фундука наилучшими вариантами оказались обработки такими препаратами, как Сценик, Клад и Ламадор, где выход стерильно жизнеспособных эксплантов составил – 44 %, 42 % и 44 %, соответственно (табл. 2). Наименее эффективным способом предобработки эксплантов было применение препарата Нистатин, выход жизнеспособных побегов при этом составил 10 %.

Таблица 2 - Влияние способа предобработки на эффективность введения эксплантов фундука *in vitro*

№ п/п	Вариант опыта	Контаминация, %	Некроз, %	Стерильные экспланты, %
1	Тебу	6	70	24
2	Сценик Комби	36	20	44
3	Клад	28	30	42
4	Ламадор	32	24	44
5	Стрептомицин	88	12	0
6	Тетрациклин	96	4	0
7	Нистатин	84	6	10
8	Контроль	92	8	0

Таким образом, для большинства исследованных препаратов установлена статистически значимая фунгицидная активность против таких патогенов, как *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Botritis* sp., развивающихся на эксплантах фундука и питательной среде в условиях *in vitro*. Однако наилучшие результаты были получены при обработке эксплантов фундука перед введением в стерильную культуру такими препаратами, как Сценик Комби, Клад и Ламадор. Объяснением таких результатов может послужить наличие в составе всех этих препаратов действующего вещества тебуконазол, однако остальные действующие компоненты препаратов различаются. Тем не менее, сочетание действующих веществ в препаратах Сценик Комби (клотианидин-протиоконазол-тебуконазол-флуоксастробин), Клад (имазалил-тебуконазол-тиабендазол) и Ламадор (тебуконазол-протиоконазол) показало перспективу для дальнейших исследований в этом направлении.

Благодарность

Коллектив авторов выражает благодарность в определении таксономической принадлежности грибов Е.В. Рогожиной, к.б.н., научному сотруднику лаборатории агрохимии и почвоведения ФГБНУ ВНИИЦиСК, Т.С. Булгакову, научному сотруднику отдела защиты растений ФГБНУ ВНИИЦиСК, а также А.Г. Мытдыевой, младшему научному сотруднику отдела защиты растений ФГБНУ ВНИИЦиСК.

Литература:

1. Махно В.Г., Горобец С.А. Продукционный потенциал сортов фундука нового поколения // Садоводство и виноградарство. 2013. №6. С. 23-27.
2. Махно В.Г., Хахо К.И. Культура фундука и проблемы его возделывания // Субтропическое и декоративное садоводство. 1989. Т. 36. С. 64-71.
3. Рындин А.В., Мохно В.С. Генетические ресурсы садовых растений в субтропиках России и возможности их использования // Субтропическое и декоративное садоводство. 2012. Т. 47. С. 13-22.
4. Рындин А.В., Терешкин А.С. Состояние и перспективы развития субтропического растениеводства на Черноморском побережье России // Субтропическое и декоративное садоводство. 2012. Т. 46. С. 13-25.
5. К вопросу стерилизации эксплантов древесных и плодовых культур при введении в условия *in vitro* / Рахмангулов Р.С. // Субтропическое и декоративное садоводство. 2018. Т. 64. С. 116-120.
6. Рахмангулов Р.С., Маляровская В.И., Самарина Л.С. Влияние предобработки побегов фундука на эффективность введения эксплантов *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2018. №65. С. 118-125.

Literature:

1. Makhno V.G., Gorobets S.A. The production potential of varieties of hazelnuts of the new generation // Horticulture and Viticulture. 2013. No. 6. P. 23-27.
2. Makhno V.G., Khakho K.I. Hazelnut culture and problems of its cultivation // Subtropical and ornamental gardening. 1989. V. 36. P. 64-71.
3. Ryndin A.V., Makhno V.S. Genetic resources of garden plants in the subtropics of Russia and the possibilities of their use // Subtropical and ornamental gardening. 2012. V. 47. P. 13-22.
4. Ryndin A.V., Tereshkin A.S. Status and development prospects of subtropical crop production on the Black Sea coast of Russia // Subtropical and ornamental gardening. 2012. V. 46. P. 13-25.
5. On the sterilization of explants of wood and fruit crops when introduced into *in vitro* conditions / Rakhmangulov R.S. // Subtropical and ornamental gardening. 2018. V. 64. P. 116-120.
6. Rakhmangulov R.S., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. The effect of pretreatment of hazelnut shoots on the efficiency of *in vitro* explant introduction // Subtropical and ornamental gardening. 2018. No. 65. P. 118-125.