

УДК 631.532.535

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro* И *ex vitro* ЮВЕНИЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

О. Ю. Гусева^{1,2}, Л. М. Стародубцева¹, В. Н. Попов²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

² Воронежский государственный университет 394018, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: guseva.oks2017@yandex.ru, ludmila.starodubtzeva@yandex.ru, pvn@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 18.12.2018 г.

Применение биотехнологических подходов с целью размножения многих древесных пород, в том числе дуба черешчатого *Quercus robur* L., может стать единственным способом сохранения и воспроизводства уникальных селекционных объектов, что имеет большое значение для практического лесоводства. Появляется возможность клонирования отдельных деревьев с хозяйственно ценными свойствами, а также генотипов, представляющих научный интерес. В экспериментах по клональному микроразмножению дуба использовался ювенильный растительный материал (сеянцы), выращенный в лаборатории. Использование дополнительного этапа дорастивания и микроразмножения эксплантов одномесячных сеянцев на средах с различным содержанием 6-бензиламинопурина (6-БАП) показало целесообразность данной процедуры. Многие культуры при дальнейшем пассировании на свежие среды продолжали развивать пазушные или адвентивные побеги, высота которых составляла 11–15 мм (в зависимости от концентрации 6-БАП). Результаты данного исследования помогут справиться с трудностями, связанными с индукцией и сохранением морфогенного потенциала эксплантов в процессе неоднократного субкультивирования. Самый высокий ризогенный ответ (73 %) был достигнут для микропобегов дуба на среде ВТМ с полным содержанием макросолей и с индолмасляной кислотой (ИМК) в концентрации 0.3 мг/л. Также было установлено, что сочетание в среде ИМК и 1-нафталинуксусной кислоты (НУК) в концентрациях 0.2 и 0.1 мг/л соответственно полностью подавляет развитие корней у микропобегов дуба черешчатого. Из четырех испытанных субстратов самый большой прирост саженцев дуба наблюдался в варианте с темно-серой лесной суглинистой почвой и песком (5.0 см). Применение двухэтапной адаптации растений-регенерантов обеспечило их 100%-ю приживаемость в лаборатории и теплице. Использование в качестве субстрата почвы, взятой из естественных дубовых насаждений, позволит значительно удешевить процесс выращивания посадочного материала.

Ключевые слова: *Quercus robur* L., клональное микроразмножение, узловыe сегменты, регуляторы роста, адвентивные побеги, ризонегез.

DOI: 10.15372/SJFS201905010

ВВЕДЕНИЕ

Род *Quercus* включает в себя около 500 видов (Savill, Kanowski, 1993). Дубы распространены во всех умеренных районах Северного полушария (Европа, Северная Америка, Азия). Это лиственные или вечнозеленые деревья. Древесина данной породы широко применяется в различных отраслях производства благодаря своей прочности и декоративности (Chalupa, 1995).

Среди европейских дубов дуб черешчатый *Quercus robur* L. имеет важное экономическое значение (наряду с дубом скальным *Q. petraea* (Matt.) Liebl. и дубом пробковым *Q. suber* L.) (Savill, Kanowski, 1993).

Однако в последнее время все чаще стал подниматься вопрос о качестве дубрав. Отмечается общее снижение площадей дубовых лесов, ухудшается состояние постоянной лесосеменной базы, в то время как доля менее продуктивных и

биологически неустойчивых порослевых насаждений увеличивается (Ширнин, 2017).

Селекция дуба затруднена по ряду причин: из-за частичной потери признаков при семенном размножении, периодичности плодоношения, длительного онтогенеза, невозможности долгосрочного хранения семян и сложности черенкования деревьев старше 10 лет. Проблема восстановления дубрав связана с климатическим и антропогенным факторами, нарушением технологий лесовыращивания (Oldfield, Eastwood, 2007; Ширнин, 2017).

Применение методов биотехнологии позволит сохранить селекционно-ценные объекты, трудно размножаемые традиционными способами, и получить оздоровленный посадочный материал.

Для культивирования *in vitro* представителей рода *Quercus* использовались различные типы эксплантов: семядоли, узловые сегменты, листья, зиготические зародыши (Chalupa, 1984, 1990, 1993; Cuenca et al., 1999; Концевая, 2008; Vengadesan, Pijut, 2009; Gómez-Garay et al., 2014). Однако наиболее часто встречаемым и эффективным способом, применяемым для клонального микроразмножения многих древесных пород, в том числе дуба, является инициация пазушных побегов на узловых сегментах с использованием ювенильного материала (Концевая, 2008; Кулагин и др., 2018).

Многие специалисты отмечают трудности при клонировании *in vitro* дуба (Chalupa, 1993). Отдельные этапы клонального микроразмножения до сих пор не отработаны как для взрослых деревьев, так и для ювенильного материала (в частности, микроразмножение и ризогенез) (Концевая, 2008). В отечественной литературе отсутствуют исследования, посвященные оптимизации условий укоренения микропобегов дуба в культуре *in vitro*, и сведения об успешной адаптации регенерантов к нестерильным почвенным условиям.

Особую сложность представляет работа со взрослым растительным материалом (Vieitez et al., 1994; Sánchez et al., 1996; Mac An tSaoir, O'Brien, 1999; Bilous, 2012; Гусева и др., 2018). Уже на начальных этапах введения в культуру сегментов старых деревьев существуют трудности получения стерильных морфогенных эксплантов из-за наличия внутренней инфекции (Mac An tSaoir, O'Brien, 1999; Концевая, 2008). Также известно, что с возрастом дерева увеличивается содержание фенолов, снижается регенерационный потенциал культур. Микропобеги,

полученные от 100–300-летних дубов, обладают слабым ризогенным ответом. В связи с этим исследователи рекомендуют использовать молодой материал, меристемные структуры, а также добавлять в состав питательной среды 6-БАП, аденин и поливинилпирролидон (Концевая, 2008). Для инициации корня часто используют среды GD и WPM с низкой концентрацией ИМК, НУК – 0.2–1.0 мг/л, макросолей и уменьшенное количество сахарозы (Chalupa, 1984). В то же время отмечено, что содержание ИМК более 1 мг/л в питательной среде приводит к каллусогенезу. Успешным для индукции ризогенеза оказалось кратковременное погружение побегов на 1–2 мин в раствор ИМК (1.0 мг/л) (Chalupa, 1993; Филимонова, 1999), либо на 2 мин с последующей пересадкой на 1/3 GD (Crecente Campo, Fernandez Lorenzo, 2008).

Отмечается низкая воспроизводимость результатов при микроразмножении дуба черешчатого, что объясняется различиями между генотипами (Vieitez et al., 1994). По этой причине целесообразно использовать для введения в культуру *in vitro* большее количество клонов (Концевая, 2008).

Все вышеописанные проблемы при культивировании дуба препятствуют созданию постоянной коллекции *in vitro* данной породы.

Целью настоящей работы было изучение влияния регуляторов роста на морфологические характеристики эксплантов дуба черешчатого в процессе культивирования *in vitro*, а также определение оптимального состава субстрата для адаптации растений-регенерантов к нестерильным почвенным условиям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для клонального микроразмножения дуба черешчатого первичными эксплантами служили узловыи сегменты сеянцев в возрасте 1 и 4 мес.

Семенной материал заготавливали в 2016 г. (желуди популяционного сбора Бутурлиновского р-на, Воронежской обл., предоставленные В. А. Кострикиным), а также в 2017 г. от 80-летних деревьев, свободно произрастающих на территории Правобережного лесничества (г. Воронеж). Посев желудей осуществляли в декабре 2016 и 2017 гг. (2016 и 2017 гг. урожая соответственно). Стерилизацию растительного материала проводили по ранее разработанной методике (Гусева и др., 2018) поэтапно с помощью хлорсодержащих моющих средств («Domestos», «Белизна»), а также 0.02%-го раствора мертиолята.

Первый месяц культивирования *in vitro* все узловые сегменты (по 200 шт. от 1- и 4-месячных сеянцев) были посажены на среду ВТМ с 6-БАП 0.2 мг/л (Chalupa, 1984). Более ранние исследования показали, что использование на начальном этапе клонального микроразмножения ВТМ с 6-БАП в концентрации 0.2 мг/л является самым оптимальным для развития пазушного побега у эксплантов дуба черешчатого, а 0.5 и 1.0 – для адвентивного побегообразования (Гусева и др., 2018). В то же время в работе V. Chalupa (1984) по клональному микроразмножению дуба черешчатого сообщалось, что применение высоких концентраций 6-БАП (более 2.0 мг/л) также приводит к образованию дополнительных побегов.

Таким образом, все полученные на первом этапе культивирования микропобеги (от 1- и 4-месячных сеянцев) высотой 1.5–3.0 см отделяли от первичных эксплантов и пересаживали на среды для ризогенеза, а оставшиеся культуры от одномесячных сеянцев подвергали дополнительному этапу дорастивания и микроразмножения. Экспланты 4-месячных сеянцев с побегами высотой менее 1.5 см далее в работе не использовались.

В опытах по дорастиванию и микроразмножению эксплантов одномесячных сеянцев (90 шт.) мы использовали базовую среду ВТМ с различным содержанием цитокинина 6-БАП в целях удлинения уже имеющихся пазушных побегов (0.2 мг/л), а также развития адвентивных (1.0 и 10.0 мг/л). Для эксплантов, высаженных на среду с 10.0 мг/л 6-БАП, концентрацию гормона снижали до 0.5 мг/л после 2 нед. от начала культивирования для элонгации побегов. Активность роста побегов у микрочеренков на данном этапе клонального микроразмножения определяли по их высоте (h_{cp} , мм) через месяц культивирования.

На этапе укоренения использовали базовую среду ВТМ (с полным или половинным содержанием макросолей) с добавлением ауксинов в различных концентрациях и комбинациях, мг/л: ИМК 0.01 + НУК 0.02; ИМК 0.1 + НУК 0.07; ИМК 0.1; ИМК 0.3; ИМК 0.2 + НУК 0.1. Всего на укоренение посажено 270 микропобегов (полученных в сумме от 1- и 4-месячных сеянцев). В качестве контроля на этапе ризогенеза выбран вариант питательной среды с самым низким содержанием ауксинов (ИМК 0.01 + НУК 0.02 мг/л).

Для перевода культур *in vitro* дуба в нестерильные условия отбирали растения с хорошо

развитой корневой системой (стержневой корень и разветвленные боковые корни) длиной в среднем 1.3–1.9 см.

Адаптация саженцев (96 шт.) проходила в 2 этапа: 1 – в условиях лаборатории и 2 – в теплице. Микрорастения извлекали пинцетом из культурального сосуда, корни обрабатывали порошком активированного угля и присыпали субстратом. Саженцы пикировали по одному в отдельные контейнеры. Для первичной адаптации использовали 4 варианта грунта (торф + песок, торф + вермикулит, торф + перлит, темно-серая лесная суглинистая почва + песок). В лаборатории поддерживались следующие условия: освещение – 1–1.5 клк, температура – +24–25 °С, влажность – не менее 80 %.

Весь адаптированный в лаборатории материал дуба пересаживали в грунт теплицы (торф + песок в соотношении 1 : 1) методом перевалки с сохранением кома первичного субстрата. Перевод растений-регенерантов в теплицу (96 шт.) проводили в период с мая по июль. Высоту саженцев учитывали через месяц после каждого этапа адаптации (в лаборатории и теплице). Уход за посадочным материалом заключался в основном в периодическом опрыскивании и поливе в течение всего вегетационного периода, а также в рыхлении почвы. Схема всех проделанных экспериментов представлена в табл. 1.

Все опыты проводили в трех повторностях (8–15 шт. на каждый опыт). Обработку полученных данных осуществляли с помощью статистического пакета Stadia. Отличия контрольных и опытных экспериментов анализировали методом попарных сравнений, используя *t*-критерий Стьюдента. Все результаты представлены как среднее значение показателя ± доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе дорастивания и микроразмножения у микрочеренков дуба черешчатого в базальной части наблюдалось обильное каллусообразование, которое стимулировало появление новых адвентивных почек (независимо от концентрации цитокинина). Некоторые экспланты погибали и останавливались в развитии (табл. 2).

Нами отмечено, что на среде с 0.2 мг/л 6-БАП наблюдалось преобладание роста пазушного побега (h_{cp} 15 мм) над адвентивными почками, появляющимися у его основания (рис. 1).

К 4-й нед. на среде с 1.0 мг/л 6-БАП активно развивались адвентивные побеги (у 83 % экс-

Таблица 1. Состав питательных сред (мг/л) и субстратов (1 : 1) при клональном микроразмножении дуба черешчатого

Этап*	Используемый растительный материал	Контроль	Вариант опытов
Доращивание и микроразмножение	Сегменты 1-месячных сеянцев с пазушным побегом длиной < 1.5 см и адвентивными почками	6-БАП 0.2	6-БАП 0.5 6-БАП 1.0 6-БАП 10.0
Укоренение	Микропобеги от 1- и 4-месячных сеянцев длиной 1.5–3.0 см	ИМК 0.01 + НУК 0.02	ИМК 0.1+НУК 0.07 ИМК 0.2+НУК 0.1 ИМК 0.1 ИМК 0.3 ИМК 0.3**
Адаптация	Укорененные <i>in vitro</i> микропобеги	Торф + песок	Торф + вермикулит Торф + перлит Лесная почва + песок

Примечание. * На всех этапах культивирования *in vitro* использовалась базовая среда ВТМ; **питательная среда ВТМ с половинным содержанием макроэлементов.

Таблица 2. Эффективность морфогенеза эксплантов одномесячных сеянцев дуба через месяц культивирования на питательной среде ВТМ с различным содержанием 6-БАП

Концентрация 6-БАП, мг/л	С адвентивными почками	С адвентивными побегами	Погибшие
	%		
0.2	65.0 ± 2.7	14.0 ± 3.6	21.0 ± 0.9
0.5***	33.0 ± 4.3	45.0 ± 2.6*	22.0 ± 0.7
1.0	–	83.0 ± 1.7**	17.0 ± 1.2

Примечание. Различия между эксплантами, образовавшими адвентивные побеги на питательной среде, содержащей 0.2 мг/л 6-БАП, по сравнению с другими вариантами достоверны при: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$; *** первые 2 нед. экспланты культивировались на среде с 10.0 мг/мл 6-БАП, далее – на 0.5 мг/л.

плантов) одинаковой длины в пределе одного экспланта (h_{cp} 11 мм). Медленнее всего проходил органогенез на среде с 10.0 мг/л цитокинина. Однако перенесение эксплантов после 2 нед. культивирования с 10.0 мг/л 6-БАП на среду с 0.5 мг/л стимулировало почти у половины микрочеренков (45 %) развитие дополнительных побегов средней длины 12.0 мм. Таким образом, наиболее оптимальными для адвентивного по-

бегообразования при микроразмножении дуба оказалась среда с 1.0 мг/л цитокинина (табл. 2, рис. 2).

На этапе ризогенеза показано, что у микропобегов от сеянцев, высаженных на питательную среду с ауксинами низкой концентрации (ИМК 0.01 мг/л и НУК 0.02 мг/л), укореняемость была слабой (не более 6 %), в то время как увеличение содержания данных гормонов (до 0.1 и 0.07 мг/л соответственно) стимулировало у эксплантов процесс корнеобразования до 40.3 %.

При использовании ИМК и НУК в концентрациях 0.2 и 0.1 мг/л укоренение полностью отсутствовало (табл. 3).

В отечественных и зарубежных работах для инициации ризогенеза у микропобегов дуба обычно применяют ауксины (ИУК, ИМК или НУК) в различных концентрациях. Результаты наших экспериментов также показали высокую эффективность ИМК для укоренения ювенильных эксплантов дуба, что согласуется с литературными данными (Chalupa, 1984, 1993; Juncker, Favre, 1989; Puddephat et al., 1999). Совместное

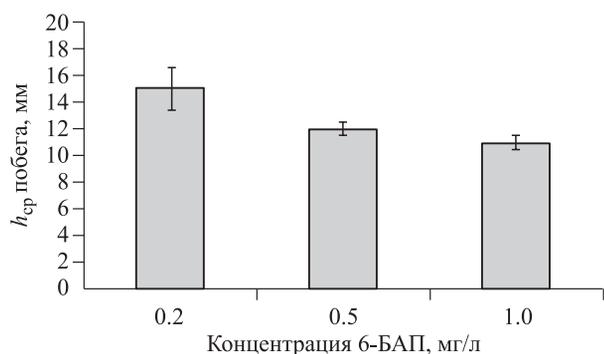


Рис. 1. Активность роста побегов у эксплантов дуба через месяц культивирования на питательной среде ВТМ с различным содержанием 6-БАП.



Рис. 2. Адвентивное побегообразование у эксплантов одномесячных семян дуба при культивировании на питательной среде ВТМ с 1.0 мг/л 6-БАП.

Таблица 3. Эффективность укоренения микропобегов дуба на питательной среде ВТМ в зависимости от состава ауксинов

Концентрация, мг/л		Доля укорененных побегов, %
ИМК	НУК	
0.01	0.02	6.0 ± 0.1
0.1	0.07	40.3 ± 5.0
0.2	0.1	0.0 ± 0.0
0.1	–	60.0 ± 1.2*
0.3	–	73.0 ± 1.1*
0.3**	–	64.0 ± 0.8*

Примечание. Различия между укоренением на питательной среде, содержащей ИМК и НУК в концентрации 0.01 и 0.02 мг/л соответственно, по сравнению с остальными вариантами достоверны при: * $p < 0.001$; ** питательная среда ВТМ с половинным содержанием макросолей.

использование ИМК и НУК приводило к угнетению процессов ризогенеза, в то время как использование только ауксина ИМК (0.3 мг/л) и полного состава питательной среды способствовало образованию корней до 73 % (см. табл. 3, рис. 3).

Полученные регенеранты аккуратно извлекали из пробирок с питательной средой и переносили в грунт с целью адаптации к нестерильным условиям *ex vitro*.

Через 5–7 дней почти у всех высаженных в субстрат растений в условиях лаборатории начинали распускаться верхушечные почки. У некоторых регенерантов появлялись дополнительные боковые побеги (до 0.5 см). Через месяц высота саженцев в варианте с торфом и вермикулитом составляла от 1.5 до 5.5 см, а ко-



Рис. 3. Инициация ризогенеза у микропобегов, полученных из семян дуба черешчатого на питательной среде ВТМ + 0.3 мг/л ИМК.



Рис. 4. Растения-регенеранты дуба черешчатого во время адаптации в лаборатории на субстрате торф + перлит.



Рис. 5. Регенеранты дуба черешчатого в лаборатории на субстратах: *а* – торф + песок; *б* – темно-серая лесная суглинистая почва + песок.



Рис. 6. Регенеранты дуба черешчатого, высаженные в теплицу из контейнеров с субстратами: *а* – торф + вермикулит; *б* – темно-серая лесная суглинистая почва + песок.

личество листьев – 5–8 шт. (прирост составил в среднем 1.3 см); в варианте торф + перлит – от 2.5 до 4 см (прирост 2.2 см) (рис. 4, табл. 4).

Через 2-3 нед. рост регенерантов на субстратах торф + вермикулит и торф + перлит прекратился и растения пересадили в грунт теплицы.

Средняя высота саженцев в лаборатории через месяц на торфопесчаном субстрате состави-

ла 3.0 см, прирост 1.3 см; на субстрате темно-серая лесная суглинистая почва + песок – 5.3 см, прирост 3.6 см (см. табл. 4, рис. 5).

В конце июля адаптированные лабораторные растения пересадили из контейнеров в грунт теплицы, где они дали еще по одному приросту. Высота микрорастений из контейнеров с торфо-песчаным субстратом составила 4.5 см

Таблица 4. Показатели роста (h_{cp} , см) регенерантов дуба черешчатого во время адаптации к нестерильным условиям *ex vitro*

Состав грунта (1:1)	Исходный	Этап адаптации				*Общий
		Лаборатория		Теплица		
Торф + песок	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2	4.5 ± 0.3	2.8 ± 2.3
Торф + вермикулит	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	2.6 ± 0.3	–	2.6 ± 0.4	1.3 ± 0.2
Торф + перлит	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	3.4 ± 0.4	–	3.4 ± 0.2	2.2 ± 0.2**
Лесная почва + песок	1.7 ± 0.2	3.6 ± 0.3	5.3 ± 0.4	1.4 ± 0.2	6.7 ± 1.1	5.0 ± 0.3***

Примечание. * Δh_{cp} – средний прирост; различия между общим приростом саженцев на грунте «торф + песок» с остальными вариантами достоверны при: ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

(с общим приростом 2.8 см), из субстрата с лесной почвой – 6.7 см (общий прирост 5.0 см) (см. табл. 4, рис. 6).

Самый большой прирост саженцев отмечен при использовании в качестве грунта лесной почвы, взятой из дубовых насаждений. Известно, что многие древесные породы (в том числе дуб черешчатый) в естественных условиях образуют симбиоз с эктомикоризными грибами (Landis, 1989). В лесных культурах микориза способствует регенерации корней, повышает устойчивость к засолению и засухе (Бурцев, 2014).

Показано также, что искусственная микоризация посадочного материала положительно влияет на рост и развитие растений (Magx, 1980). По-видимому, активный рост растений-регенерантов дуба в условиях нашего эксперимента может быть связан с наличием в субстрате с лесной почвой микоризных грибов. Все саженцы (независимо от состава первичного субстрата) успешно прошли адаптацию в теплице (приживаемость составила 100 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперименты показали, что культуры одномесячных семян дуба черешчатого обладали разной морфогенной способностью в зависимости от содержания 6-БАП в питательной среде. Рассмотрен один из возможных способов сохранения морфогенного потенциала у эксплантов дуба в культуре *in vitro* – этап микроразмножения и доращивания побегов на питательных средах с различным содержанием цитокинина (развитие пазушных побегов на среде с 0.2 мг/л, адвентивное побегообразование – 0.5 и 1.0 мг/л 6-БАП). Определены оптимальные условия укоренения для ювенильного материала (1- и 4-месячных семян) дуба черешчатого. Получена опытная партия посадочного материала *ex*

in vitro дуба черешчатого. Более активный рост и развитие саженцев наблюдались при использовании темно-серой лесной суглинистой почвы с песком в соотношении 1 : 1, что может быть связано с микоризацией субстрата. Применение метода биотехнологии для размножения дуба может стать единственным способом сохранения и воспроизводства этого уникального селекционного объекта, что имеет большое значение для практического лесоводства.

Авторы выражают признательность сотрудникам ВНИИЛГИСбиотех В. А. Кострикину, О. С. Машиковой и Т. М. Табацкой за предоставленный растительный материал и критические замечания в ходе подготовки статьи к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурцев Д. С. Зарубежный опыт искусственной микоризации семян лесных древесных пород с закрытой корневой системой // Тр. СПбНИИ лесн. хоз-ва. 2014. № 1. С. 47–61.
- Гусева О. Ю., Стародубцева Л. М., Попов В. Н. Получение морфогенных культур *in vitro* дуба черешчатого с использованием эксплантов из ювенильного и взрослого материала // Тр. СПбНИИ лесн. хоз-ва. 2018. № 2. С. 18–29.
- Концевая И. И. Определение условий введения дуба черешчатого в культуру *in vitro* // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: мат-лы Междунар. науч. конф., 3–6 дек. 2008 г., Минск. Минск: Изд. центр Бел. гос. ун-та, 2008. С. 103–105.
- Кулагин Д. В., Константинов А. В., Падутов В. Е. Использование культур *in vitro* для сохранения генетического разнообразия при создании насаждений дуба черешчатого в Беларуси // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. II Междунар. науч.-практ. конф., Респ. Беларусь, Минск, 28–31 мая 2018 г., Минск. Минск: Бел. гос. ун-т, 2018. С. 130.

- Филимонова Л. В. Размножение дуба черешчатого пирамидальной формы для защитного лесоразведения в Нижнем Поволжье: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.03.04. Волгоград: ВНИАЛМИ, 1999. 23 с.
- Ширнин В. К. Проблемы восстановления дубрав Центрального Черноземья желудями улучшенной селекционной категории // Современная лесная наука: проблемы и перспективы: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф., 20–22 дек. 2017 г. Воронеж: Истоки, 2017. С. 138–142.
- Bilous S. Yu. Biotechnological aspects of reproduction of centuries-old oak Maksim Zaliznak in the in vitro culture // Лісовісадово-паркове господарство. 2012. N. 2. P. 25–34.
- Chalupa V. In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) // Biol. Plant. 1984. N. 26. P. 374–377.
- Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* L.), beech (*Fagus sylvatica* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) by means of cuttings and explant culture // Lesnictvi (Forestry). 1990. N. 36. P. 589–598.
- Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Q. robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture // Ann. Sci. For. 1993. N. 50. P. 295–307.
- Chalupa V. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) // Somatic embryogenesis in woody plants. 1995. N. 2. P. 67–87.
- Crecente Campo S., Fernandez Lorenzo J. L. Injerto en serie 'acelerado' de *Quercus robur* adulto // Cuad. Soc. Esp. Cienc. For. 2008. V. 24. P. 45–50.
- Cuenca B., San-José M. C., Martínez M. T., Ballester A., Vieitez A. M. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. // Plant Cell Rep. 1999. V. 18. Iss. 7–8. P. 538–543.
- Gómez-Garay A., Manzanera J. A., Pintos-Lopez B. Embryogenesis in oak species // For. Syst. 2014. V. 23. Iss. 2. P. 191–198.
- Juncker B., Favre J. M. Clonal effects in propagating oak trees via in vitro culture // Plant Cell Tissue and Organ Cult. 1989. V. 19. N. 3. P. 267–276.
- Landis T. D. The container tree nursery manual. The biological component: nursery pests and mycorrhizae. Washington, DC: USDA, For. Serv., 1989. 171 p.
- Mac An tSaoir S., O'Brien J. Ex-vitro growth studies of *Quercus robur* // Irish For. 1999. V. 56. N. 2. P. 18–21.
- Marx D. H. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices // Tropical mycorrhiza research. Oxford Univ. Press, 1980. P. 13–71.
- Oldfield S., Eastwood A. The red list of oaks. Cambridge, UK: Fauna & Flora Int., 2007. 35 c.
- Puddephat I. J., Alderson P. G., Wright N. A. In vitro root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L. // Ann. Appl. Biol. 1999. V. 134. Iss. 2. P. 233–239.
- Sánchez M. C., San-José M. C., Ballester A., Vieitez A. M. Requirements for in vitro rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees // Tree Physiol. 1996. N. 16. P. 673–680.
- Savill P. S., Kanowski P. J. Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies // Ann. Sci. For. 1993. V. 50. P. 368–383.
- Vengadesan G., Pijut P. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.) // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2009. N. 97. P. 141–149.
- Vieitez A. M., Sánchez M. C., Amo-Marco J. B., Ballester A. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation // Plant Cell Tissue Organ Cult. 1994. N. 37. P. 287–295.

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS *in vitro* AND *ex vitro* OF JUVENILE MATERIAL OF PEDUNCULATE OAK

O. Yu. Guseva^{1,2}, L. M. Starodubtseva¹, V. N. Popov²

¹ All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Selection and Biotechnology
Lomonosov str., 105, Voronezh, 394087 Russian Federation

² Voronezh State University
Universitetskaya Ploshchad', 1, Voronezh, 394018 Russian Federation

E-mail: guseva.oks2017@yandex.ru, ludmila.starodubtzeva@yandex.ru, pvn@bio.vsu.ru

The application of biotechnological approaches for producing numerous tree species, including pedunculate oak *Quercus robur* L., may become the only way to preserve and reproduce unique breeding objects, which is of great importance for practical forestry. It is now possible to clone individual trees with valuable properties and scientifically advantageous genotypes. In experiments on clonal micro propagation of oak, juvenile plant material (seedlings) was grown in the laboratory. The use of additional stage of rearing and micropropagation of explants of one-month seedlings on media with different volume of 6-benzylaminopurine (6-BAP) showed the expediency of this procedure. When applying *ex vitro* media, many cultures continued to develop axillary or adventive shoots, the height of which was 11–15 mm (depending on the concentration of 6-BAP). The results of this study will help to cope with the difficulties associated with the induction and preservation of the morphogenic potential of explants in the process of repeated subculturing. The highest rhizogenic response (73 %) was achieved for the micro buds of juvenile material on BTM medium with full composition of macronutrients and indolylbutyric acid (IBA) at a concentration of 0.3 mg/l. It was also found that the combination of IBA and 1-naphthalenacetic acid (NAA) in concentrations of 0.2 and 0.1 mg/l, respectively, completely suppresses the development of roots in micro shoots of pedunculate oak. Of the 4 tested substrates, the highest increase in oak seedlings was observed in the variant with forest oak soil and sand (5.0 cm). The use of two-stage adaptation of regenerative plants ensured their 100 % survival in the laboratory and greenhouse. The use of soil as a substrate, taken from natural oak plantations, will significantly reduce the cost of the process of growing planting material.

Keywords: *Quercus robur* L., clonal micropropagation, nodal segments, plant growth regulators, adventive shoots, rhizogenesis.

How to cite: Guseva O. Yu., Starodubtseva L. M., Popov V. N. Optimization of cultivation conditions *in vitro* and *ex vitro* of juvenile material of pedunculate oak // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2019. N. 5. P. 81–89 (in Russian with English abstract).