

УДК 57.085.2:582.632.2

ОСОБЛИВОСТІ ОПТИМІЗАЦІЇ РОСТУ ТКАНИН РОСЛИН ДУБА ЗВИЧАЙНОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) *IN VITRO*

О. Ю. ЧОРНОБРОВ, PhD,

завідувач науково-дослідної лабораторії біотехнології рослин

<https://orcid.org/0000-0002-1330-8878>

Відокремлений підрозділ Національного університету біоресурсів і природокористування України «Боярська лісова дослідна станція»

E-mail: oksana_chornobrov@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/bio2019.04.007>

Нині одним із актуальних завдань лісового господарства України є розроблення ефективної і відтворювальної технології масового тиражування високоякісного садивного матеріалу рослин дуба звичайного (*Quercus robur* L.). Одним із підходів до вирішення поставленого завдання є використання методу культури ізольованих тканин рослин *in vitro*. Значна кількість біотехнологічних публікацій зосереджена на розробленні ефективних протоколів мікроклонального розмноження для окремих генотипів рослин родини Fagaceae Dumort. У той же час автори відзначають про досить низьку регенераційну здатність тканин деревних рослин цієї родини в умовах *in vitro*. Мета дослідження – оптимізація росту мікропагонів рослин *Q. robur in vitro* для масового мікроклонального розмноження. Для досліджень використовували фрагменти пагонів рослин *Q. robur* із 50–100-річних донорів у весняно-літній період 2018 – 2019 рр. Застосовували біотехнологічні і статистичні методи досліджень. Установлено умови одержання значної кількості (понад 80 %) асептичних життєздатних експлантатів рослин *Q. robur in vitro* за використання NaClO і AgNO_3 . Значною регенераційною здатністю (понад 80 %) характеризувалися фрагменти пагонів *in vitro*, культивовані на базовому середовищі за прописом WPM (McCown & Lloyd, 1981). Розроблено ефективну процедуру оптимізації росту тканин *Q. robur*, що дозволила отримати понад 60 % регенераційно здатного рослинного матеріалу *in vitro*. Одержано значну кількість мікропагонів рослин *Q. robur* на середовищі WPM із 2-ІП (N-ізопентеніламінопурин), аденіном, активованим вугіллям і ПВП (полівінілпіролідон) (коефіцієнт мультиплікації – $5,5 \pm 0,7$, цикл культивування – 45–50 діб). Подальші дослідження спрямовані на масове мікроклональне розмноження мікропагонів рослин *Q. robur* різними типами морфогенезу *in vitro*.

Ключові слова: *Quercus robur* L., культура тканин рослин *in vitro*, оптимізація росту тканин рослин *in vitro*, експлантати, живильне середовище, мікроклональне розмноження, мікропагони *in vitro*

Актуальність. Наразі розроблення ефективної технології масового тиражування оздоровленого садивного матеріалу цінних лісотвірних рослин є одним із актуальних завдань. Ураховуючи надзвичайно

важливе значення рослин дуба звичайного (*Quercus robur* L.) для багатьох галузей господарства постає питання щодо розробки технології швидкого розмноження цінних екземплярів. Одним із підходів для

вирішення задачі є використання метода культури ізольованих тканин рослин *in vitro*. Такий метод, на противагу традиційним способам розмноження, дозволяє отримувати оздоровлені, генетично однорідні рослини упродовж року із мінімальної кількості донорного матеріалу, збільшити коефіцієнт розмноження та одержати нові господарські цінні варіанти і мутанти внаслідок соматоклональної мінливості (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1983; Smith, 2012).

Аналіз останніх публікацій. Наразі мікроклонування цінних генотипів рослин *Q. robur* проводять у Польщі (Інститут дендрології Польської академії наук), Білорусії (Державна наукова установа «Інститут лісу Національної академії наук Білорусії») та в Україні (Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція»). Зокрема, вітчизняними та зарубіжними авторами (Chalupa, 1984; Poljakova, 2002; Пінчук, Чорнобров, 2006; Кулагин, 2012; Гречаник та ін., 2012; Чорнобров, Олексійченко, 2014) проведені дослідження щодо введення в культуру *in vitro* окремих генотипів рослин родини *Fagaceae* Dumort. Група авторів (Gloria Pinto et al., 2002) розробили технологію одержання рослин-регенерантів *Quercus suber* L. шляхом соматичного ембріогенезу із листових пластинок дорослого донора. Для стерилізації рослинного матеріалу використовували 70 % етиловий спирт, розчин абсолютного спирту, 30 % розчин перекису водню та 0,1 % розчин Benlate (Gloria Pinto et al., 2002). Інші дослідники (José Silvestre et al., 2013) розробили ефективний режим стерилізації експлантатів рослин *Quercus* spp. за використання 70 % етилового спирту та 5,25 % гіпохлориту натрію. Для введення в культуру *in vitro* рослин як експлантати використовували частини стебел, які культивували на середовищах WPM (McCown & Lloyd, 1981) та MS (Murashige &

Skoog, 1962) з додаванням 1–20 мкМ БАП (6-бензиламінопурин). Зазначають, що найбільш оптимальним для мікроклонального розмноження рослин було середовище WPM із додаванням 20 мкМ ВАР. Водночас багаточисленними дослідженнями підтверджено, що регенерація тканин деревних рослин в умовах *in vitro*, особливо вікових екземплярів, залежить від низки чинників (генетичні, фізіологічні, гормональні, фізичні), а оптимізація їх росту – досить складний фізіологічний процес (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Poljakova, 2002; Гузь та ін., 2012; Чорнобров, 2014). У наших попередніх публікаціях зазначені способи стерилізації зародків із фрагментами ендосперму *Q. robur*, встановлено оптимальні умови калусоутворення експлантатів та досліджена регенераційна здатність тканин *in vitro* за дії регуляторів росту (Чорнобров та ін., 2017, 2018). Наступним етапом дослідження було одержання мікропагонів із значною регенераційною здатністю, визначення ефективності використання різних методик для її посилення та добір найоптимальніших.

Мета дослідження – оптимізація росту мікропагонів рослин *Q. robur in vitro* для масового мікроклонального розмноження.

Матеріали та методи дослідження. Для досліджень використовували пагони рослин *Q. robur* завдовжки 15–20 см, які ізольовували із 50–100-річних донорів у весняно-літній період 2018–2019 рр. Стерилізацію рослинного матеріалу проводили такими розчинами речовин: 0,1 % HgCl_2 , 1,0 % AgNO_3 , 2,5 % NaClO з попередньою обробкою 70 % етиловим спиртом (до 1 хв). Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1983; Smith, 2012). Рослинний матеріал (фрагменти пагонів з однією брунькою завдовжки 1,0–1,5 см) вводили в культуру *in vitro* на базове безгормональне живиль-

не середовище за прописом MS із додаванням $2,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля. Регенераційну здатність тканин рослин *in vitro* досліджували на базових MS, WPM, DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) на 30 добу культивування. До модифікованих живильних середовищ вносили $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ інозитолу, $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарози, $7,0\text{--}7,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ агару мікробіологічного та регулятори росту цитокінінового типу дії (6 - фулфуриламінопурин (кінетин) та N-ізопентеніламінопурин (2-іП). Показник кислотності середовища (pH) доводили до рівня 5,7–5,9.

Для оптимізації росту тканин рослин *Q. robur* на етапі власне мікроклонального розмноження використовували низку методик: застосування ентеросорбентів (полівінілпіролідон (ПВП), активоване вугілля), антиоксидантів (аскорбінова кислота), витримування в умовах пониженої температури, часті субкультивування рослинного матеріалу, чергування безгормональних із гормональними живильними середовищами, табл. 4). Ефективність застосування останніх визначали за такими показниками, як: частка регенераційно здатних експлантатів (%), довжина мікропагона (см), основний тон забарвлення. До регенераційно здатних експлантатів відносили експлантати, які відновили мікропагони із бруньок. Контроль – культивування експланта-

тів на базовому WPM за загальноприйнятою методикою. Експлантати – мікропагони завдовжки 1,5–1,6 см, які культивували на модифікованих середовищах WPM упродовж 15 діб у весняно-літній період.

Рослинний матеріал культивували у світловому приміщенні за температури $24 \pm 1^\circ \text{C}$ і освітлення 2,0–3,0 клк із 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %. Для досліджень використовували такі методи: біотехнологічні (культура тканин рослин *in vitro*, мікроклональне розмноження), статистичні (середнє арифметичне, стандартна похибка, однофакторний кореляційний аналіз). Статистично експериментальні дані опрацьовували з використанням пакета аналізу MS Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати стерилізації рослинного матеріалу *Q. robur* за використання широкого спектру розчинів стерилізуючих речовин наведено в таблиці 1.

За нашими спостереженнями, понад 60 % інфікування експлантатів становило грибне (2–10-та доба культивування), на бактеріальне припало дещо менше – 30 % (проявлялось дещо пізніше, 7–13-та доба), змішаний тип інфікування охопив не більше 10 % (2–13-та доба) (рис. 1, а).

Аналіз експериментальних даних свідчить, що для фрагментів пагонів рослин

1. Ефективність стерилізації фрагментів пагонів рослин *Q. robur in vitro*

Варіант	Режим стерилізації експлантатів	Ефективність стерилізації фрагментів пагонів рослин (середнє значення \pm стандартна помилка), %
1	2,5 % NaClO протягом 10 хв	$20,0 \pm 4,1$
2	2,5 % NaClO упродовж 20 хв	$32,5 \pm 4,8$
3	1,0 % AgNO ₃ протягом 10 хв	$12,5 \pm 2,5$
4	1,0 % AgNO ₃ упродовж 20 хв	$15,0 \pm 2,9$
5	1,0 % AgNO ₃ протягом 10 хв з наступним перенесенням у 2,5 % NaClO	$87,5 \pm 4,8$
6	0,1 % HgCl ₂ протягом 5 хв	$57,5 \pm 2,5$
7	0,1 % HgCl ₂ упродовж 10 хв	$67,5 \pm 2,5$

Q. robur недоцільно використовувати варіанти стерилізації № 1, 2, 3 і 4, оскільки у цих процедурах її ефективність не перевищила 30%. Використання гіпохлориту натрію для стерилізації рослинного матеріалу *Q. robur*, на відміну від результатів досліджень зарубіжних колег (José Silvestre et al., 2013), було неефективним.

У разі застосування 0,1 % HgCl_2 упродовж 5–10 хв одержали понад 50 % асептичних життєздатних мікропагонів. Для нейтралізації мікробіоти пагонів доцільно використовувати ступінчастий спосіб, який полягав у витримуванні в 2,5 % NaClO упродовж 10 хв із наступним перенесенням у 1,0 % AgNO_3 . За таких умов

витримування на 15–17 добу культивування одержали значну ефективність стерилізації (понад 80 %).

Для культивування рослинного матеріалу деревних рослин *in vitro*, зокрема рослин родини *Fagaceae* в основному використовують, живильні середовища за прописом MS, WPM та DKW із різними комбінаціями і концентраціями регуляторів росту. Після одержання асептичних життєздатних експлантатів рослин *Q. robur* визначати їх регенераційну здатність на різних варіантах безгормональних живильних середовищах (табл. 2).

Результати експериментів із дослідження регенераційної здатності експлантатів рос-



Рис. 1. Послідовність етапів мікроклонального розмноження рослин *Q. robur in vitro*: а) експлантати інфіковані міцелієм грибів на 5-добу культивування; б) асептичні життєздатні мікропагони на WPM на 30-добу культивування; в) вторинні метаболіти у середовищі на 36-добу культивування; г) і д) регенеранти, які загинули; е) рослинний матеріал у чашках Петрі за пониженої температури ($+4 \pm 1^\circ\text{C}$); ж) 15-добові мікропагони рослин на живильному середовищі WPM; к) і л) рослини-регенеранти в культуральному приміщенні.

лин показали доцільність використання, як базового, живильного середовища WPM (рис. 1, б). Схожі результати одержали група зарубіжних авторів (José Silvestre et al., 2013) при культивуванні фрагментів стебел рослин *Quercus* spp. На середовищі MS одержали $60,0 \pm 4,1$ % експлантів здатних до регенерації. З рівнем надійності 0,05 можна стверджувати, що вплив базового живильного середовища на частку регенераційно здатних експлантів є статистично значущим ($F = 36,75$, $F_{\text{крит.}} = 4,2565$; $F > F_{\text{крит.}}$) (табл. 3).

Починаючи із 35 доби культивування, у 90 % експлантів фіксували значне зниження регенераційної активності, зміну основного тону забарвлення листкових пластинок та інтенсивне виділення вторинних метаболітів тканинами (візуально – потемніння живильного середовища у основи експлантів) (рис. 1, в). За результатами досліджень, на 90 добу культивування, понад 90 % рослинного матеріалу *Q. robur* загинуло (рис. 1, г, д).

Оптимізацію росту тканин рослин *Q. robur* *in vitro* проводили за використання різних методик, ефективність яких наведена у таблиці 4. Результати проведених досліджень виявили, що лише комплексне використання декількох процедур ефективно для одержання регенераційно здатних мікропагонів рослин *Q. robur*. Зокрема, у разі застосування двох ентеросорбентів (активоване вугілля і ПВП) у WPM, чергування гормональних із безгормональними живильними середовищами за достатньо короткого циклу культивування одержали понад 60 % активно ростучих мікропагонів *Q. robur* (табл. 4, варіант 7; рис. 1, ж).

В основі фармакологічних властивостей ПВП лежить дезинтоксикаційна дія, яка полягає в здатності до комплексоутворення, а механізм дії полягає в здатності активно зв'язувати токсини і виводити із рослинного організму. Значні результати із оптимізації тканин (понад 45 %) також отримано за використання 6 комплексної методики. Застосування 1–5 методик є недоцільним: лише незначна частка експлантів регенераційно здатна.

Життєздатні мікропагони культивували на живильному середовищі WPM із додаванням $0,5\text{--}1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 2-ІП, $20 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ аденіну, $2,0 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля і $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$

2. Регенераційна здатність тканин рослин на етапі введення у культуру *in vitro* *Q. robur*, 30 діб

Варіант	Базове живильне середовище	Частка регенераційно здатних експлантів (середнє значення \pm стандартна помилка), %
1	MS	$60,0 \pm 4,1$
2	WPM	$85,0 \pm 2,9$
3	DKW	$45,0 \pm 2,9$

3. Підсумкові результати однофакторного дисперсійного аналізу

Дисперсійний аналіз						
Джерело варіації	SS	df	MS	F	P- значення	F критичне
Між групами	3267	2	1633,3333	36,75	4,67	4,2565
В середині груп	400	9	44,4444			
Разом	3667	11				

де: α – рівень надійності; df – число степенів свободи; MS – дисперсії; F – розрахункове значення критерію Фішера; P – значення – розрахункове значення мінімальної значущості; $F_{\text{крит.}}$ – критичне значення критерію Фішера

4. Ефективність оптимізації росту тканин рослин *Q. robur* за використання різних методик (середовище WPM, весняно-літній період, 15 діб в культурі *in vitro*)

Варіант	Використані методики	Показники ефективності оптимізації росту тканин рослин <i>in vitro</i> на 15 добу		
		частка регенераційно здатних експлантатів ² , %	довжина мікропагона ² , см	основний тон забарвлення мікропагона
K ¹	стандартне культивування експлантатів на базовому WPM	10,0 ± 3,2	1,1 ± 0,2	салато-во-жовтий
1	витримування експлантатів у розчині аскорбінової кислоти (1,0 мг·л ⁻¹)	17,5 ± 4,8	1,4 ± 0,2	-/-/-
2	кожні 2–3 доби субкультивування рослинного матеріалу на нові живильні середовища	20,0 ± 4,1	1,7 ± 0,1	салатовий
3	чергування безгормональних середовищ із гормональними (кожні 3–5 діб)	30,0 ± 4,1	2,1 ± 0,2	-/-/-
4	додавання до живильного середовища 2,0 г·л ⁻¹ активованого вугілля	25,0 ± 2,9	2,0 ± 0,2	салато-во-жовтий
5	використання 2,0 мг·л ⁻¹ ПВП	20,0 ± 4,1	1,4 ± 0,1	-/-/-
6	споліскування експлантатів розчині аскорбінової кислоти (1,0 мг·л ⁻¹) із наступним витримуванням на живильному середовищі в чашках Петрі за T = + 4 ± 1 °C упродовж доби	45,0 ± 4,1	2,4 ± 0,1	зелений
7	1) внесення до живильного середовища 2,0 г·л ⁻¹ активованого вугілля і 2,0 мг·л ⁻¹ ПВП; 2) чергування безгормональних середовищ із гормональними (0,25–0,50 мг·л ⁻¹ кінетину) (цикл культивування 3–5 діб)	60,0 ± 4,1	3,1 ± 0,4	-/-/-
Примітки: 1) контроль; 2) вказано середнє значення ± стандартна помилка				

ПВП. За таких умов на 45–50 добу культивування одержали мікропагони завдовжки – 4,7 ± 0,4 см, коефіцієнт мультиплікації – 5,5 ± 0,7 (рис. 1, к, л). Схожі результати отримали зарубіжні автори (José Silvestre et al., 2013) за культивування фрагментів стебел рослин *Quercus* spp. на середовищі WPM із додаванням цитокиніну БАП.

Отже, у результаті проведених досліджень одержано активно-ростучі мікропагони рослин *Q. robur* зі значною регенераційною здатністю для подальшого масового мікроклонального розмноження та одержання рослин-регенерантів.

Висновки і перспективи. Ефективна стерилізація (понад 80 %) фрагментів пагонів рослин *Q. robur* *in vitro* досягалася шляхом їх ізоляції у весняно-літній період та витримуванням у 2,5 % NaClO упродовж 10 хв із наступним перенесенням у 1,0 % AgNO₃. Значною регенераційною здатністю на етапі введення (понад 80 %) характеризувалися експлантати *in vitro*, культивовані на базовому живильному середовищі за прописом WPM. Доведена доцільність оптимізації росту тканин рослин *Q. robur* у весняно-літній період упродовж 60–90 діб за наступною процедурою: вико-

ристання живильного середовища WPM із 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля і 2,0 мг·л⁻¹ ПВП, чергування гормональних (0,25–0,50 мг·л⁻¹ кінетину) із безгормональними живильними середовищами за циклу культивування 3–5 діб. Оптимальні умови для одержання мікропагонів *Q. robur* створені на живильному середовищі WPM із

додаванням 0,5–1,0 мг·л⁻¹ 2-іП, 20,0 мг·л⁻¹ аденіну, 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля і 2,0 мг·л⁻¹ ПВП (цикл культивування – 45–50 діб, коефіцієнт мультиплікації – 5,5±0,7). Подальші дослідження спрямовані на масове мікроклональне розмноження оптимізованих мікропагонів рослин *Q. robur* різними типами морфогенезу *in vitro*.

Література

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений: учеб. пособ. М.: Наука, 1964. 272 с.
2. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с.
3. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
4. Кулагин Д. В. Получение и индивидуальные особенности культур *in vitro* дуба черешчатого. Сборник научных трудов «Институт леса Национальной академии наук Беларуси». 2012. Вып. 72. С. 232–240.
5. Живильне середовище для мікроклонального розмноження рослин дуба звичайного (*Quercus robur* L.): пат. 124736 Україна: МПК (2018.01), C12N 1/00, A01H 4/00. № у 2017 09681; заявл. 04.10.2017; опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8.
6. Спосіб отримання асептичної культури зародків рослин дуба звичайного (*Quercus robur* L.): пат. 124737 Україна: МПК (2018.01), A01H 4/00. № у 2017 09682; заявл. 04.10.2017; опубл. 25.04.2018, Бюл. № 8.
7. Спосіб розмноження *in vitro* плюсових дерев бука лісового (*Fagus silvatica* L.): пат. 68765 Україна, МПК (2012.01) A01H 4/00. № у 2011 11325; заявл. 26.09.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7.
8. Пінчук А. П., Чорнобров О. Ю. Особливості мікроклонального розмноження дуба звичайного (*Quercus robur*), кленів гостролистого (*Acer plantanoides* L.) та псевдоплатанового (*Acer pseudo-platanus* L.). Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. 2006. Т. 4. № 1. С. 76–83.
9. Чорнобров О. Ю. Дія регуляторів росту на регенераційну здатність експлантатів рослин *Quercus robur* L. *in vitro*. Біоресурси і природокористування України, серія «Біологія». 2017. Том 9. № 3–4. С. 13–19.
10. Чорнобров О. Ю. Особливості введення в культуру *in vitro* рослин Бука лісового (*Fagus silvatica* L.). Лісове і садово-паркове господарство. 2014. № 5. Режим доступу до журн. <http://ejournal.studnubip.com/zhurnal-5/ukr/>
11. Chalupa V. *In vitro* Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). Biol. Plant. 1984. Vol. 26, № 5. P. 374–377.
12. Driver J. A., Kuniyuki A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. HortScience. 1984. Vol. 19. P. 507–509.
13. Gloria Pinto, Helena Valentim, Armando Costa, Silvia Castro, and Conceicao Santos. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2002. Vol. 38. P. 569–572.
14. José Silvestre Delgadillo-Díaz de León, José Francisco Morales-Domínguez, María del Socorro Santos-Díaz, Eugenio Pérez-Molphe-Balch. *In vitro* propagation of mexican oaks (*Quercus* spp.). Polibotánica. 2013. № 35. P. 85–97.
15. McCown B. H., Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) – A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. HortScience. 1981. Vol. 16. P. 453.
16. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid, Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473.
17. Poljakova L. W. Biochemical Marker of the Oak Leaves (*Quercus robur* L.) on Resistant to Microsphaera Amphitoides Grif. Et Suitable for Microclonal Propagation of 1–3 Year Old Seedlings. Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources. Yalta, 2002. P. 15.
18. Smith R. H. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. 2012. 55 pp.

References

1. Butenko, R.G. (1964). *Kultura izolirovanykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy* [Culture of Isolated Tissues and Physiology of Plant Morphogenesis]. Moscow, Russia: Science, 272.
2. Kalinin, F. L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. (1980). *Metody kultury tkaney v fiziologii i biokhimii rasteniy* [Methods of Tissue Culture in Plant Physiology and Biochemistry]. Kiev: Naukova dumka, 488.
3. Kataeva, N. V., Butenko, R. H. (1983). *Klonalnoe mykrorazmnozhenye rasteniy* [Clonal Micropropagation of Plants]. Moscow, Russia: Science, 96.
4. Kulagin, D.B. (2012). *Poluchenie i individualnye osobennosti kultur in vitro duba chereschatoho* [Obtaining and Individual Features of English oak in vitro Cultures]. Collection of scientific works of Forest Institute of National Academy of Sciences of Belarus. Belarus (Hemel), 72, 232-240.
5. Bilous, S. Yu., Chornobrov, O. Yu., Karpuk, A. I., Marchuk, Yu. M. (2018). Culture Medium for Microclonal Propagation of English Oak Plants. Patent of Ukraine for useful model. A01H 4/00. № 124736; declared 04.10.2017; published 25.04.2018, № 8.
6. Chornobrov, O. Yu., Bilous, S. Yu., Karpuk, A. I., Moroziuk, O. V., Marchuk, Yu. M. (2018). A Method of Obtaining Aseptic Culture of the Embryos of English Oak Plants. Patent of Ukraine for useful model. A01H 4/00. № 124737; declared 04.10.2017; published 25.04.2018, № 8.
7. Hrechanyk, R. M., Huz, M.M., Lisovy M.M. (2012). The Method of in vitro Propagation of European beech (*Fagus silvatica* L.) Valuable Trees. Patent of Ukraine for useful model. A01H 4/00. № 68765; declared 26.09.2011; published 10.04.2012, № 7.
8. Pinchuk, A. P., Chornobrov, O. Yu. (2006). *Osoblyvosti mikroklonalnoho rozmnozhenia duba zychainoho (Quercus robur L.), kleniv hostrolystoho (Acer plantanoides L.) ta psevdoplatanovo-ho (Acer pseudoplatanus L.)* [Peculiarities of Micropropagation of English Oak (*Quercus robur* L.), Norway Maple (*Acer plantanoides* L.) and Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.)]. The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders, 4 (1), 76–83.
9. Chornobrov, O. Yu. (2017). *Diia rehulatoriv rostu na reheneratsiinu zdattist eksplantativ roslin Quercus robur L. in vitro* [Effect of Growth Regulators on in vitro Regenerative Ability of Explants of *Quercus robur* L.] Life and Environmental Sciences of Ukraine, series "Biology", 9 (3–4), 13–19.
10. Chornobrov, O.Yu., Oleksiichenko, N.O. (2014). *Osoblyvosti vvedennia v kulturu in vitro roslin Buka lisovoho (Fagus silvatica L.)* [Peculiarities of Beech (*Fagus silvatica* L.) Plants Introduction to in vitro Culture]. Forestry and Horticulture, 5, <http://ejournal.studnubip.com/zhurnal-5/ukr/>
11. Chalupa, V. (1984). In vitro Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biol. Plant.*, 26 (5), 374–377.
12. Driver, J. A., Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro Propagation of Paradox Walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. *HortScience*, Vol. 19, 507–509.
13. Gloria Pinto, Helena Valentim, Armando Costa, Silvia Castro, and Conceicao Santos (2002). Somatic Embryogenesis in Leaf Callus from a Mature *Quercus Suber* L. Tree. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, Vol. 38, 569–572.
14. José Silvestre Delgadillo-Díaz de León, José Francisco Morales-Domínguez, María del Socorro Santos-Díaz, Eugenio Pérez-Molphe-Balch (2013). In vitro Propagation of Mexican Oaks (*Quercus* spp.). *Polibotánica*, № 35, 85–97.
15. McCown, B.H., Lloyd, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM) – A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, Vol. 16, P. 453.
16. Murashige, T. A., Skoog F. (1962). Revised Medium for Rapid, Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15 (3), 473.
17. Poljakova, L.W. (2002). Biochemical Marker of the Oak Leaves (*Quercus robur* L.) on Resistant to *Microsphaera Amphitoides* Grif. Et Suitable for Microclonal Propagation of 1–3 Year Old Seedlings. *Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources*, 15.
18. Smith, R. H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, 55.

SUMMARY

O. Yu. Chornobrov. Optimization of in vitro tissues growth of english oak (*Quercus robur* L.) plants. *Biological Resources and Nature Managment*. 2019. 11, №5–6. P.58–66. <https://doi.org/10.31548/bio2019.04.007>

Abstract. The development of an effective technology for the mass production of high quality planting material of English Oak plants (*Quercus robur* L.) is one of the urgent tasks of forestry in Ukraine nowadays. One approach to solving this problem is to use of in vitro the plant tissues culture method. A lot of number of biotechnological researches are focused on the development of effective microclonal propagation protocols for genotypes of plants of the Fagaceae Dumort. family. At the same time, the authors note that the regenerative ability of the tissues of woody plants of this family in vitro is rather low. The aim of the research was the optimization of growth of *Q. robur* in vitro shoots for mass microclonal propagation. For the studies that were carried out in spring-summer period 2018–2019, the fragments shoots of 50–100-year-old donors plants of *Q. robur* were used. Biotechnological and statistical research methods were used. It was found out that the

effective sterilization (above 80 %) of *Q. robur* fragments shoots was obtained through the use of NaClO and AgNO₃. A significant regenerative ability (above 80 %) had in vitro shoots cultured on WPM culture medium (McCown & Lloyd, 1981). An effective technique for optimization of growth of *Q. robur* tissues has been developed, which made it possible to obtain above 60 % of regenerative plant material in vitro. A significant number of *Q. robur* plants was obtained on WPM culture medium with 2iP, adenine, activated carbon and PVP (multiplication factor – 5.5 ± 0.7 , cultivation cycle 45–50 days). Further studies are aimed microclonal propagation of shoots of *Q. robur* plants with various types of in vitro morphogenesis.

Keywords: English Oak (*Quercus robur* L.), plant tissue culture in vitro, optimization of growth of shoots, explants, culture medium, microclonal propagation, shoots in vitro

АННОТАЦІЯ

О. Ю. Чернобров. Особенности оптимизации роста тканей растений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) in vitro. Биоресурсы и природопользование. 2019. **11**, №5–6. P.58–66. <https://doi.org/10.31548/bio2019.04.007>

Аннотация. В настоящее время одной из актуальных задач лесного хозяйства Украины является разработка эффективной технологии массового получения качественного посадочного материала растений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Одним из подходов к решению поставленной задачи является использование метода культуры изолированных тканей растений in vitro. Значительное количество биотехнологических публикаций сосредоточено на разработке эффективных протоколов микроклонального размножения для отдельных генотипов растений семейства Fagaceae Dumort. В то же время авторы отмечают о достаточно низкой регенерационной способности тканей древесных растений данного семейства в условиях in vitro. Цель исследования – оптимизация роста микропобегов растений *Q. robur* in vitro для массового микроклонального размножения. Для исследований использовали фрагменты побегов растений *Q. robur* с 50–100-летних доноров в весенне-летний период 2018–2019 гг. Применяли биотехнологические и статистические методы исследований. Установлено условия получения значительного количества (более 80 %) асептических жизнеспособных эксплантов растений *Q. robur* in vitro при использовании NaClO и AgNO₃. Значительную регенерационную способность (более 80 %) имели микропобеги in vitro, культивируемые на базовой среде по рецепту WPM (McCown & Lloyd, 1981). Разработано эффективную методику оптимизации роста тканей *Q. robur*, которая позволила получить более 60 % регенерационно способного растительного материала in vitro. Получено значительное количество микропобегов растений *Q. robur* на среде WPM с 2-иП (N-изопентиламинопурин), аденином, активированным углем и ПВП (поливинилпирролидон) (коэффициент мультипликации – $5,5 \pm 0,7$, цикл культивирования – 45–50 суток). Дальнейшие исследования направлены на массовое микроклональное размножение оптимизированных микропобегов растений *Q. robur* различными типами морфогенеза in vitro.

Ключевые слова: дуб черешчатый (*Quercus robur* L.), культура тканей растений in vitro, оптимизация роста тканей растений in vitro, экспланты, питательная среда, микроклональное размножение, микропобеги in vitro