

УДК 602.6:582.685.4

**ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ БАГАТОВІКОВОГО ДЕРЕВА
«ДУБ Т. Г. ШЕВЧЕНКА»**

С. Ю. Білоус, кандидат біологічних наук

А. А. Ключаденко, кандидат сільськогосподарських наук

О. О. Марчук, кандидат сільськогосподарських наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: forest_biotech@nubip.edu.ua

Анотація. Багатовікові дерева – природна спадщина, яка становить унікальний науковий інтерес та в історичному контексті пов'язана з видатними постатями і подіями в історії України.

Розробка методики мікроклонального розмноження багатовікових дерев забезпечить отримання рослин-регенерантів багатовікових дерев, унікальні об'єкти живої природи.

Обґрунтовано актуальність мікроклонального розмноження історично цінних багатовікових дерев. Проведено експерименти з використанням різних концентрацій і комбінацій стерилізуючих речовин 70 % C_2H_5OH , 0,1 % $HgCl_2$ з метою отримання асептичного рослинного матеріалу багатовікового дерева «Дуб Т. Г. Шевченка», здатного до морфогенезу *in vitro*. Встановлено основні етапи стерилізації експлантів дуба Т. Г. Шевченка *in vitro* й отримання морфогенно активних первинних мікропагонів. З'ясовано, що ріст і розвиток первинних мікропагонів залежав від стерилізуючої речовини, яку використовували на початку введення, і типу експланта.

Найменшу контамінацію і найбільший відсоток життєздатних експлантів дуба Т. Г. Шевченка отримано за комплексної стерилізації з використанням 70 % C_2H_5OH , 0,1 % $HgCl_2$ упродовж 8 хв і триразового відмивання у стерильній dH_2O – 5 хв.

Відпрацьовано етап отримання асептичної культури багатовікового дерева «Дуб Т. Г. Шевченка», за результатами якого ефективність стерилізації дорівнювала 60 % експлантів, що формували регенеранти на 21–27 добу культивування *in vitro*.

Ключові слова: дерево «Дуб Т. Г. Шевченка», мікроклональне розмноження, експлант, живильне середовище, рослина-регенерант, *in vitro*.

Актуальність. На території України зростають сотні багатовікових дерев, серед яких є декілька десятків рослин із винятковим історичним і культурних

значенням (дерева «Дуб Максима Залізняка», «Дуб Т. Г. Шевченка», «Липа Т. Г. Шевченка» тощо) [7].

Багатовікові дерева – природна спадщина, яка становить унікальний науковий інтерес та в історичному контексті пов’язана з видатними постатями і подіями в історії України. Проведення наукових досліджень багатовікових дерев України сприятиме ідентифікації та збереженню національної природної спадщини, формуванню соціальної відповідальності населення за охорону навколишнього середовища.

Розробка методики мікроклонального розмноження багатовікових дерев дасть змогу вирішити практичне завдання отримання оздоровлених клонів найбільш цінних генотипів і створити передумови для проведення фундаментальних досліджень питання, яким чином вік дерева позначається на рості і розвитку його тканин і органів, їхньої здатності до регенерації. За наявності відпрацьованої методики клонування багатовікових дерев процес отримання оздоровленого рослинного матеріалу є доволі швидким і не дуже дорогим. За практичного використання методики мікроклонального розмноження, цілком можливо, що в майбутньому клони оздоровлених історично-цінних багатовікових дерев можуть стати основою для створення унікальної колекції генетично-ідентичних клонів багатовікових дерев України на базі Ботанічного саду НУБіП України, використовуватись з метою селекції.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. На території Києва зростають декілька сотень вікових дерев віком від 100 до 900 років, вони є екологічною, культурно-історичною та естетичною цінністю. Загалом відомо більш ніж 140 місць зростання таких дерев. Станом на грудень 2009 р. 86 місць зростання з загальною кількістю вікових дерев 349 внесено до Державного природно-заповідного фонду України. Двадцять дерев Києва увійшли до списку 500 видатних дерев України, який склав та опублікував окремим виданням у 2011 р. Київський еколого-культурний центр [3].

В Україні досвід дослідження багатовікових дерев біотехнологічними методами досить обмежений: обмаль публікацій із мікроклонального

розмноження, ДНК-аналізу унікальних історично-цінних дерев для встановлення їхніх еволюційно-екологічних особливостей.

Питаннями збереження і лікування багатовікових дерев в Україні займається група дослідників на чолі з А. І. Кушніром (2010, 2011), зусилля яких спрямовано на розроблення технічних рішень і засобів щодо оздоровлення багатовікових дерев в Україні [3; 4].

Інвентаризацію вікових дерев дуба звичайного на території старовинного урочища Феофанія, створення електронної карти їх розташування і проведення дендрохронологічних досліджень здійснили вчені Інституту еволюційної екології НАН України (М. В. Нецветов, Ю. В. Прокопук, Р. К. Матяшук та ін.) [5; 6].

Розподіл вікових деревних рослин дендропарку «Софіївка» за біометричними показниками вивчали: В. П. Шлапак, Г. І. Музика, В. А. Вітенко, Л. І. Марно та ін. [8].

Закордонні наукові роботи, присвячені багатовіковим деревам, найчастіше подають результати дендрохронологічних досліджень історії клімату та еволюції екосистем (Т. W. Swetnam, К. F. Kipfmüller, 2001) [12].

Серед зарубіжних учених спроби мікроклонального розмноження багатовікових дерев проводили М. Bayraktar, S. Kuusiene [10].

Мета дослідження: підбір оптимальних умов стерилізації для отримання асептичної культури багатовікового дуба Т. Г. Шевченка й збереження здатності тканин до морфогенезу в умовах *in vitro*.

Об'єкт дослідження – багатовікове дерево «Дуб Т. Г. Шевченка» (м. Київ) вік близько 400 років, обхват – 4,5 м, висота – 15 м. Дуб росте на території парку садово-паркового мистецтва місцевого значення «Березовий гай», що по вул. Вишгородська, 5, неподалік від меморіального музею Т. Г. Шевченка «Хата на Пріорці» [3].

Матеріали і методи дослідження. У дослідженнях експлантами слугували частини пагонів із брунькою у безлистому стані та штучно пробуджені бруньки (рис. 1). Пагони нарізали на фрагменти по 1,5–4 см і промивали у

мильному розчині упродовж 20 хв на магнітній мішалці або шейкері. Потім зразки промивали під проточною водою і переносили у посудину зі стерильною дистильованою водою. Усі наступні маніпуляції проводили в ламінарному боксі.



Рис. 1. Вихідні експланти з багатовікового дерева «Дуб Т. Г. Шевченка»:

а – штучно пробуджені пагони; б – здерев'янілі

Стерилізацію розпочинали із занурення вихідного рослинного матеріалу в 70-відсотковий розчин етанолу (C_2H_5OH) 30 с. Як основний стерилізуючий агент використовували розчин хлориду ртуті ($HgCl_2$) 0,1 % з різною експозицією 5–15 хв. Після цього експланти промивали тричі у стерильній dH_2O . Усі роботи з рослинними тканинами проводили спираючись на загальноприйняті методи [1; 2].

Перед висадкою на агаризоване живильне середовище експланти розрізали на сегменти 1,0–1,5 см з однією брунькою. За основний показник ефективності стерилізуючої речовини було прийнято кількість експлантів, що нормально розвивались у культурі *in vitro*.

На початкових етапах введення в культуру *in vitro* багатовікового дерева «Дуб Т. Г. Шевченка» використовували живильні середовища (ЖС) за прописом Мурасіге і Скуга (MS) [14] і Драйвера (DKW) [11]. Для підвищення морфогенетичного потенціалу експлантів і регулювання процесів морфогенезу до складу ЖС вносили у різних співвідношеннях та концентраціях фітогормони цитокінінового типу дії: 6-бензиламінопурин (БАП) $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, тидіазурон (ТДЗ)

(0,25-5,0 мг·л⁻¹), кінетин 0,25 мг·л⁻¹. Також до живильних середовищ додавали агар 7 г·л⁻¹, мезоінозитол 0,1 г·л⁻¹, джерелом вуглеводного живлення слугувала сахароза 30 г·л⁻¹, величина рН середовища – 5,6–5,7. Додатково до складу ЖС вносили глутатіон – це трипептид, що складається із амінокислот L-глутамату, L-цистеїну и гліцину, є важливим регуляторним механізмом під час біохімічних процесів у клітинах. Виконує антиоксидазну функцію у середині клітин, що є важливою умовою для її життя та розвитку, особливо в умовах стресу [1; 2; 13].

Експланти культивували за температури 24±2°C, 16-годинного фотоперіоду та постійного освітлення інтенсивністю 2000–3000 лк.

Результати дослідження та їх обговорення. Стерилізація рослинного матеріалу є невід'ємною частиною на перших етапах мікроклонального розмноження. Якість її, значною мірою, залежить від стериліанта, його концентрації та експозиції. Ключовим завданням є підбір стерилізуючої речовини, яка б знешкоджувала патогенну мікрофлору і не мала негативного впливу на ріст і розвиток рослинних тканин у культурі *in vitro*.

Процес отримання асептичної культури з експлантів багатолітніх дерев ускладнений через ендогенну та екзогенну ураженість тканин, інтенсивне виділення вторинних метаболітів у живильне середовище та часте внутрішнє пошкодження рослинних тканин, якого не видно ззовні.

Під час досліджень було виявлено, що здерев'янілі експланти багатолітніх дерев дуба, які мали тріщини, заглибини, пошкодження, також характеризувались складністю отримання асептичних експлантів. У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, а й потрапляння всередину стерилізуючого розчину негативно впливало на ріст тканин експлантів.

У результаті випробувано декілька варіантів стерилізації. Ріст і розвиток первинних експлантів варіював залежно від часу експозиції та типу експланта.

Штучно пробуджені бруньки краще піддавались стерилізації за використання як стериліанта розчину (HgCl₂) 0,1 % з експозицією 5 хв та триразового відмивання у стерильній dH₂O 5 хв. За таких умов було отримано 60 % асептичних і здатних до регенерації експлантів дуба Т. Г. Шевченка. За

експозиції 10–15 хв у 0,1 % розчині HgCl_2 усі експланти характеризувались окисненням рослинних тканин, отже, були не здатні до регенерації (рис. 2).

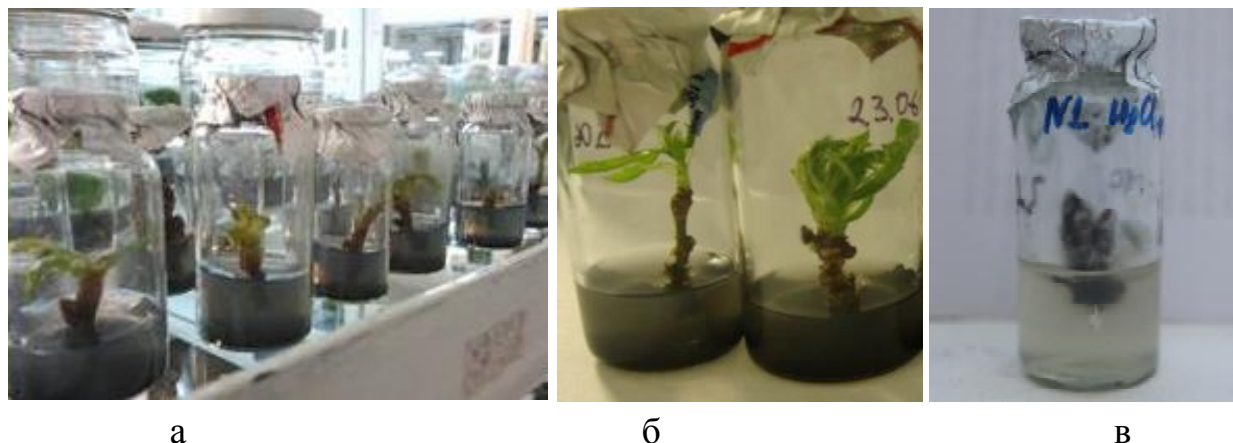


Рис. 2. Результати отримання асептичних експлантів багатовікового дуба Т. Г. Шевченка: а – грибне інфікування експланта; б – асептичні, життєздатні експланти; в – асептичні первинні мікропагони *in vitro*

Здерев'янілі пагони витримували у розчині HgCl_2 0,1 % упродовж 8–9 хв і тричі відмивали у стерильній dH_2O . У результаті отримано 50 % асептичних і здатних до регенерації експлантів дуба Т. Г. Шевченка. Ефективність стерилізації здерев'янілих мікропагонів за експозиції 10 хв сягала 30 % асептичних і здатних до регенерації експлантів. Було з'ясовано, що інфікування рослинних тканин проявлялось на 3 добу незалежно від експозиції, при цьому здерев'янілі пагони були більш схильні до ураження.

Висновки і перспективи. Найефективнішою для фрагментів здерев'янілих пагонів є стерилізація з використанням 70-відсоткового розчину $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 30 с, 0,1-відсоткового розчину HgCl_2 (8 хв), із триразовим відмиванням у стерильній dH_2O 5 хв. Ефективність стерилізації при цьому становила 50 %, а для штучно пробуджених пагонів – 60 %. У всіх асептичних експлантів, отриманих у такий спосіб, через 25–27 діб спостерігали активацію пазушних бруньок, а через 35–40 діб – формування асептичних первинних мікропагонів.

Встановлено, що для збалансованого росту і розвитку первинних асептичних експлантів багатовікового дуба в культурі *in vitro* та запобігання впливу вторинних метаболітів на них, до живильних середовища рекомендовано

додавати глутатіон у концентрації 1 мг·л⁻¹. Використання активованого вугілля у тій самій концентрації є недостатнім.

На перших етапах мікроклонального розмноження ефективним виявилось живильне середовище MS та DKW з додаванням ТДЗ у концентрації 0,25 мг·л⁻¹ та живильне середовище з 0,5 мг·л⁻¹ БАП з додавання глутатіону 1 мг·л⁻¹ у всіх варіантах. Субкультивовані первинні мікропагони вдало проявляли здатність до морфогенезу.

У результаті досліджень оптимальними експлантами для введення в культуру *in vitro* є як здерев'янілі, так і штучно пробуджені пагони багатовікового дуба Т. Г. Шевченка за умови індивідуального використання способу стерилізації.

Отже, успішне отримання асептичних первинних експлантів і субкультивованих рослин-регенерантів створює передумови для дослідження особливостей та підбору складових живильного середовища та умов культивування для масової регенерації *in vitro* шляхом прямого морфогенезу.

Список використаних джерел

1. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1975. – 51 с.
2. Ковалевський С. Б. Культура *Populus tremula* L. / С. Б. Ковалевський, С. Ю. Білоус – К. : НУБіП України, 2014. – 189 с.
3. Кушнір А. І. Стан та перспективи збереження багатовікових історичних дерев дуба в ботанічному саду НУБіП України / А. І. Кушнір, О. В. Колесніченко, О. А. Суханова, С. І. Слюсар, І. Л. Кушнір // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Біологія, біотехнологія, екологія». – 2012. – Вип. 178. – С. 27–33.
4. Кушнір А. І. Новітні технології збереження вікових дерев у Європі / А. І. Кушнір, В. Грижерчик, О. А. Суханова // Науковий вісник Національного лісотехнічного університету України : зб. наук.-техн. пр. – Львів : РВВ НЛТУ України, 2011. – Вип. 21.16. – С. 240–245.
5. Матяшук Р. К. Вікові дуби «Феофанії» – пам'ятки живої природи краю [Електронний ресурс] / Р. К. Матяшук, В. Б. Небесний, С. М. Конякін, І. В. Ткаченко // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – № 6. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2014_6_18.

6. Нецветов М. В. Вік і радіальний приріст старовікових дерев *Quercus robur* парку «Феофанія» / М. В. Нецветов, Ю. С. Прокопук // Український ботанічний журнал. – 2016. – Т. 73, № 2. – С. 126–133.
7. Олексійченко Н. О. Види роду *Tilia* L. у насадженнях м. Києва : монографія / Н. О. Олексійченко, М. О. Совакова, О. В. Соваков, О. І. Китаєв, С. І. Слюсар. – К. : ЦП «Компринт», 2013. – 245 с.
8. Шлапак В. П. Біометричні показники вікових деревних рослин дендропарку «Софіївка» та їх розподіл за віковими категоріями / В. П. Шлапак, Г. І. Музика, В. А. Вітенко, Л. І. Марно // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.5. – С. 8–15.
9. Шнайдер С. Л. 500 выдающихся деревьев Украины / С. Л. Шнайдер, В. Е. Борейко, Н. Ф. Стеценко. – К. : ЛОГОС, Киевский экологокультурный центр, Государственная служба заповедного дела Минприроды Украины, 2011. – 204 с.
10. Bayraktar M. Micropropagation of centennial tertiary relict trees of *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots [Електронний ресурс] / M. Bayraktar, S. Nayta, S. Parlak, A. Gurel. – Trees. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2015. – Режим доступу: http://www.researchgate.net/publication/275329600_Micropropagation_of_centennial_tertiary_relict_trees_of_Liquidambar_orientalis_Miller_through_meristematic_nodules_produced_by_cultures_of_primordial_shoots.
11. Driver J. A. In vitro propagation of Paradox walnut root stock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // Hort Science. – 1984. – 19. – P. 507–509.
12. Kipfmüller K. F. Using dendrochronology to reconstruct the history of forest and woodland ecosystems / K. F. Kipfmüller, T. W. Swetnam et al. // The historical ecology handbook: a restorationist's guide to reference ecosystems. – Island Press, Washington, DC, 2001. – P. 199–228.
13. Svetla D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple / D. Svetla, G. Sara, F. Ervinet // Plant Sci. – 2003. – 165. – P. 299–309.
14. Murashige T. A revised medium for rapid, grow than dbioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plantarum. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473–497.
15. Ostrolucka M. Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* spp.) / M. Ostrolucka, M. Bezo. – 1994. – Genet. Pol. 35. – P. 161–169.
16. Paula M. P. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity / M. P. Paula, S. L. Shaneka, H. M. Charles // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2011. – Vol. 47, Issue 1. – P. 123–147.

References

1. Butenko, R. G. (1975). Eksperymentalnyi morfohenez i dyferentsiatsiia v kulturi klityn roslyn [Experimental morphogenesis and differentiation in plant tissue culture]. Moscow, Nauka, 51.
2. Kovalevsky, S. B., Bilous, S. Yu. (2014). Kultura *Populus tremula* L. [Culture of *Populus tremula* L.] Kyiv, NUBiP, 189.

3. Kushnir, A. I., Kolesnichenko, O. V., Sukhanova, O. A., Sliusar, S. I., Kushnir, I. L. (2012). Stan ta perspektyvy zberezhennia bahatovikovykh istorychnykh derev duba v botanichnomu sadu NUBiP Ukrainy [Status and perspectives of preservation of centuries-old historical oak trees in the botanical garden of NUBiP of Ukraine]. Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 178, 27–33.
4. Kushnir, A. I., Hryzherchyk, V., Sukhanova, O. A. (2011). Novitni tekhnolohii zberezhennia vikovykh derev u Yevropi [The latest technology in the preservation of age-old trees in Europe]. Scientific Bulletin of National Forestry University of Ukraine, 21.16, 240–245.
5. Matiashuk, R. K., Nebesnyi, V. B., Koniakin, S. M., Tkachenko, I. V. (2014). Vikovi duby “Feofanii” – pamjiatky zhyvoi pryrody kraiu [The age-old oaks “Theophany” - memorials of the wildlife of the region]. Scientific reports of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 6.
6. Netsvetov, M. V., Prokopuk, Yu. S. (2016). Vik i radialnyi pryrist starovikovykh derev *Quercus robur* parku “Feofaniia” [The age and radial growth of the old-fashioned trees of the *Quercus robur* of Theophany Park]. Ukrainian botanical journal, V, 2, 126–133.
7. Oleksiichenko, N. O., Sovakova, M. O., Sovakov, O. V., Kytaiev, O. I., Sliusar, S. I. (2013). Vydy rodu *Tilia* L. u nasadzheniakh m. Kyieva [Species of the genus *Tilia* L. in plantings of Kyiv city]. Kyiv, 245.
8. Shlapak, V. P., Muzyka, H. I., Vitenko, V. A., Marno, L. I. (2011). Biometrychni pokaznyky vikovykh derevnykh roslyn dendroparku “Sofiivka” ta yikh rozpodil za vikovymy katehoriiami [Biometric indicators of age-old tree plants of the dendropark “Sofiivka” and their distribution by age categories]. Scientific Bulletin of National Forestry University of Ukraine, 21.5, 8–15.
9. Shnayder, S., Boreyko, V., Stetsenko, N. (2011). 500 vudaiushchykh sia derevev Ukrainy [500 exceptional trees of Ukraine]. Kyiv, 204.
10. Bayraktar, M., Hayta, S., Parlak, S., Gurel, A. (2015). Micropropagation of centennial tertiary relict trees of *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots. Trees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
11. Driver, J. A., Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut root stock. Hort Science, 19, 507–509.
12. Kipfmüller, K. F., Swetnam, T. W. (2001). Using dendrochronology to reconstruct the history of forest and woodland ecosystems. The historical ecology handbook: a restorationist's guide to reference ecosystems. Island Press, Washington, 199–228.
13. Svetla, D., Sara, G., Ervinet, F. (2003). Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple. Plant Science, 165, 299–309.
14. Murashige, T., Scoog, A. (1962). A revised medium for rapid, grow than dbioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plantarum*, 15, 3, 473–497.
15. Ostrolucka, M., Bezo, M. (1994). Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* spp.). *Genet. Pol.* 35, 161–169.

16. Paula, M. P., Shaneka, S. L., Charles, H. M. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 47, 1, 123–147.

ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ МНОГОВЕКОВОГО ДЕРЕВА «ДУБ Т. Г. ШЕВЧЕНКО»

С. Ю. Белоус, А. А. Клюваденко, О. О. Марчук

Аннотация. Многовековые деревья – природные объекты, имеющие уникальный научный интерес и в историческом контексте связанные с выдающимися фигурами и событиями в истории Украины.

Разработка методики микроклонального размножения многовековых деревьев обеспечит получение растений-регенерантов уникальных объектов живой природы.

*Обоснована актуальность микроклонального размножения исторически ценных многовековых деревьев. Проведены эксперименты с использованием различных концентраций и комбинаций стерилизующих веществ 70% C_2H_5OH , 0,1-процентный $HgCl_2$ с целью получения асептического растительного материала многовекового дерева «Дуб Т. Г. Шевченко» со свойством к морфогенезу *in vitro*. Определены основные этапы стерилизации эксплантов дуба Т. Г. Шевченко *in vitro* и получение морфогенно активных первичных микропобегов. Установлено, что рост и развитие первичных эксплантов зависели от стерилизующего вещества, которое использовали в начале введения, а также типа эксплантов.*

Доказано, что минимальная контаминация и максимальный процент жизнеспособных эксплантов дуба Т. Г. Шевченко получены при комплексной стерилизации с использованием 70 % C_2H_5OH , 0,1 % $HgCl_2$ 8 мин и трехразовом отмывании в стерильном dH_2O – 5 мин.

*Отработано этап получения асептической культуры многовекового дуба Т. Г. Шевченко, по результатам которого достигнута эффективность стерилизации 60 % эксплантов, которые формировали регенеранты на 21–27 сутки культивирования *in vitro*.*

Ключевые слова: *дерево «Дуб Т. Г. Шевченко», микроклональное размножение, эксплант, питательная среда, растение-регенерант, *in vitro*.*

OBTAINING OF ASEPTIC CULTURE OF OLD VALUE TREE “OAK T. SHEVCHENKO”

S. Bilous, A. Klyvadenko, O. Marchuk

Abstract. The centuries-old trees – natural heritage, which has a unique scientific interest and historical context associated with prominent figures and events in the history of Ukraine.

Creation of technique microclonal reproduction-old trees could preserve the unique objects of nature.

Topicality of getting aseptic cultures of old value tree has been substantiate.

The experiments with using different concentrations and combinations of sterilizing agents such as 70 % C₂H₅OH, 0,1 % HgCl₂ for obtaining of aseptic plant material of tree “Oak T. Shevchenko” for capable of morphogenesis in vitro were determined.

The basic steps of sterilize explants of tree “Oak T. Shevchenko” in vitro and features of morphogenic receiving active primary microshoots were established.

It was found that the growth and development of primary explants depends on sterilizing substances used for the introduction and type of shoots.

Investigated that the much less contamination and the largest percentage of viable explants of tree “Oak T. Shevchenko” have been obtained with using the complex of solution 70 % C₂H₅OH, 0,1 % HgCl₂ 8 min and three-time washing in sterile dH₂O – 5 min.

The conditions of sterilization, which was selected much less influenced on plant tissues and provide receipt of 60% of viable aseptic explants of tree “Oak T. Shevchenko”, after 21–27 days of cultivation in vitro have been forming of primary microshoots.

Keywords: *old value tree “Oak T. Shevchenko”, microclonal propagation, explant, nutrition medium, plant regenerant, in vitro.*