

Научная статья

УДК 630\*52:630\*174.754

<https://doi.org/10.25686/2306-2827.2024.1.55>

EDN: DEMOOK

## Введение в культуру *in vitro* зелёных неодревесневших черенков дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) разных возрастных групп

А. А. Тимаков<sup>1✉</sup>, Р. В. Сергеев<sup>1</sup>, Е. М. Романов<sup>1</sup>, А. Р. Хусаинова<sup>2</sup>, В. Г. Краснов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Поволжский государственный технологический университет,  
Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3

<sup>2</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева,  
Российская Федерация, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 49

TimakovAA@volgatech.net ✉

**Введение.** Дуб черешчатый – основная лесообразующая порода дубрав. Малая эффективность традиционного размножения дуба черешчатого на фоне снижения общей продуктивности дубрав является проблемой для всего мира и России в частности. Решить проблему можно благодаря применению современных методов культуры ткани *in vitro*. **Цель исследования** – разработать методику получения первичных эксплантов дуба на основе зелёных черенков. **Задачи работы** – 1) оценить влияние минерального состава питательной среды и обработки эксплантов аскорбиновой кислотой на эффективность введения эксплантов дуба разных возрастных групп; 2) определить воздействие питательной среды и режима стерилизации на экспланты дуба на ювенильной, имматурной и генеративной стадиях развития. **Материалы и методы исследования.** Объектами исследования были выбраны черенки дуба черешчатого *Quercus robur* L. разных возрастных групп – ювенильной, имматурной и генеративной. Методы исследования были основаны на общепринятых классических приёмах работы с культурами изолированных тканей и органов растений, в результате которых были получены жизнеспособные экспланты дуба черешчатого, а также проведены корреляционно-регрессионный и дисперсионный анализ. **Результаты.** Большое количество жизнеспособных ювенильных эксплантов было получено на питательной среде по прописи WPM – от 96,43 до 100 %. Наибольшая доля не жизнеспособных ювенильных эксплантов приходится на вариант опыта с питательной средой по прописи MS – 22,22 %. Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на генеративной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от 70,59 до 100 %. При этом наибольшее число жизнеспособных стерильных эксплантов получено при использовании экспозиции в стерилизующем средстве от 4 мин. 30 сек. **Выводы.** Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на ювенильной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от 96,43 до 100 %, в то время как по прописи MS – 77,78 %. Таким образом, среда WPM является лучшим выбором при введении в культуру зелёных черенков дуба черешчатого при выбранном режиме стерилизации. Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на генеративной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от 70,59 до 100 % по сравнению с 50 % на питательной среде по прописи MS. Значительное влияние на количество жизнеспособных стерильных эксплантов оказал режим стерилизации и оптимальная экспозиция зелёных черенков дуба черешчатого в генеративной фазе в 3 % растворе Лизоформина 3000 начинается от 4,5 мин. с показателями жизнеспособности эксплантов от 87,5 до 100 %. Полученные результаты можно использовать для разработки технологии размножения и выращивания дуба черешчатого *in vitro*.

**Ключевые слова:** эксплант; поверхностная стерилизация; питательная среда; клональное микроразмножение

© Тимаков А. А., Сергеев Р. В., Романов Е. М., Хусаинова А. Р., Краснов В. Г., 2024

**Для цитирования:** Тимаков А. А., Сергеев Р. В., Романов Е. М., Хусаинова А. Р., Краснов В. Г. Введение в культуру *in vitro* зелёных неодревесневших черенков дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) разных возрастных групп // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2024. № 1 (61). С. 55–65. <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2024.1.55>; EDN: DEMOOK

**Введение.** Дуб черешчатый является основной лесообразующей породой таких биоценозов, как дубравы. Дубовые леса России в основном располагаются в европейской (3,52 млн. га) и дальневосточной частях (2,46 млн. га) [1]. Однако представители рода *Quercus* подвержены множеству негативных факторов, среди которых: большое количество паразитирующих насекомых, ухудшение санитарного состояния, снижение общей и удельной продуктивности дубовых биоценозов; снижение репродуктивной способности (т. е. увеличение промежутков между урожайными годами и снижение обилия урожая); синдром усыхания (отмирания) дуба и т. д. [2, 3]. Эти проблемы приводят к сокращению общей площади дубовых биоценозов. В связи с длительным сокращением площадей естественных дубрав разработаны федеральные программы их сохранения и изучения, причём эта проблема характерна не только для России [3–5]. Таким образом, малая эффективность традиционного размножения дуба черешчатого на фоне снижения общей и удельной продуктивности дубрав является объективной проблемой для всего мира и России в частности. Решить проблему можно благодаря применению современных методов биотехнологии, например, культуры ткани *in vitro*. Данный метод отличается внесезонностью проведения исследований, ювенилизацией посадочного материала, высокой эффективностью. Однако ключевым фактором является оздоровление получаемого посадочного материала. Кроме того, культура ткани растений является эффективным инструментом сохранения биологических ресурсов, а полученные стерильные экспланты могут при необходимости быть использованы для ещё более надёжного криодепонирования, создания «банков» ценных генотипов [6]. Частным случаем метода культуры ткани *in vitro* является клональное микроразмножение [7–8].

Проблематика клонального микроразмножения дуба черешчатого и введение этого растения в культуру *in vitro* освеще-

на в работах Г. Л. Бутовой [9–10], В. И. Белоус [11–12], С. Ю. Белоус и Ю. Коломиец [13], А. А. Марчук и В. И. Кирилук [14], В. Г. Краснова с соавт. [15], G. Vengadesan, P. M. Pijut [16], E. Gatti, E. Sgarbi [17], D. Civinova, Z. Sladky [18], A. Grigorescu et al. [19] и др. Основной проблемой является стабильное получение стерильной хорошо растущей культуры эксплантов дуба черешчатого. Причина – значительная доля заражения во взрослых растениях (до 92 %) в зависимости от вида, ареала произрастания и т. д. [5]. Таким образом, разработка эффективных и вариативных методов введения в культуру *in vitro* биоматериала дуба черешчатого является актуальным направлением в лесной биотехнологии.

При введении в культуру *in vitro* растительные экспланты проходят процедуру поверхностной стерилизации, при этом используются различные дезинфицирующие средства, способные эффективно удалять с поверхности эксплантов бактериальные и грибные инфекции. Например, сотрудники ВНИИЛГИС-биотех смогли получить 80–100 % жизнеспособных асептических эксплантов при использовании 0,02 % раствора мертиолята в течение 10 мин. [20].

**Цель** настоящего исследования – разработать методику получения первичных эксплантов дуба на основе зелёных черенков.

**Задачи** исследования – 1) оценить влияние минерального состава питательной среды и обработки эксплантов аскорбиновой кислотой на эффективность введения эксплантов дуба разных возрастных групп; 2) определить воздействие питательной среды и режима стерилизации на экспланты дуба на ювенильной, иматурной и генеративной стадиях развития.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования были выбраны черенки дуба черешчатого *Quercus robur* L. разных возрастных групп – ювенильной, иматурной и генеративной. Источником ювенильного биоматериала послужили сеянцы дуба черешчатого возрастом

2–2,5 мес., высотой до 20–25 см, имматурного – растения высотой 65–70 см, генеративного – около 10 м высотой. Все группы растений были разнесены по местоположению – сеянцы были выращены в комнатных условиях, имматурный биоматериал был получен в деревне Малые Мазары (Республика Марий Эл), а генеративный биоматериал был получен в городских условиях – микрорайон Дубки (г. Йошкар-Ола).

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Поволжский государственный технологический университет». Методы исследования были основаны на общепринятых классических приёмах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [8], в результате которых были получены жизнеспособные экспланты дуба черешчатого, а также проведены корреляционно-регрессионный и дисперсионный анализы.

1. *Получение жизнеспособных эксплантов дуба черешчатого на ювенильной фазе онтогенеза.* Для проведения исследования в январе 2023 года были посеяны жёлуди дуба черешчатого (в кассеты), появившиеся в феврале 2023 года проростки были пересажены в отдельные ёмкости большего объёма и доращивались до возраста 2–2,5 месяцев. Для посева и пересадки использовали садовую почву, обработанную в целях обеззараживания раствором марганцево-кислого калия (0,5 %). Двухмесячные растения затем использовали в качестве источника эксплантов: зелёные побеги срезали до первой розетки в пять листьев, после чего разделяли на фрагменты длиной 3–4 см, удаляли все листовые пластинки (таким образом, чтобы не повредить пазушные почки) и погружали в водопроводную воду на 60 мин. Затем экспланты очищали от механических загрязнений с помощью губки и моющего средства «Ника» (5 мл средства на 500 мл

воды), промывали в проточной водопроводной воде в течение 5 мин., а затем трёхкратно промывали в дистиллированной воде.

Дальнейшие операции проводили в условиях ламинар-бокса. Экспланты помещали в 3 % раствор стерилизующего средства Лизоформин 3000 на 5 мин., после чего двукратно промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 5 мин., а затем (в зависимости от варианта опыта, табл. 1) помещали либо в стерильную дистиллированную воду на 20 мин., либо в стерильный раствор аскорбиновой кислоты концентрацией 100 мг/л. Затем на эксплантах, для удаления повреждённых стерилизующим веществом тканей, обновляли все срезы. После этого экспланты переносили на агаризованную питательную среду, либо по прописи MS (контроль) [21], либо по прописи WPM [22] в зависимости от варианта опыта (табл. 1). Во все варианты питательных сред добавлялся регулятор роста – бензиламинопурина (БАП) в концентрации 1 мг/л. Культивирование вели в условиях световой комнаты при температуре 23–24 °С. Подсчёт заражённых, жизнеспособных и не жизнеспособных эксплантов проводили после одной недели культивации.

Таблица 1. Схема эксперимента по стерилизации ювенильных эксплантов дуба черешчатого при обработке аскорбиновой кислотой

Table 1. Scheme of the experiment on sterilization of juvenile explants of English oak when treated with ascorbic acid

| № | Состав питательной среды | Наличие обработки эксплантов аскорбиновой кислотой, да/нет |
|---|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1 | MS 1 БАП, контроль       | нет                                                        |
| 2 | WPM 1 БАП                | нет                                                        |
| 3 | WPM 1 БАП                | да                                                         |

2. *Получение жизнеспособных эксплантов дуба черешчатого на имматурной и генеративной фазах онтогенеза.* Для проведения исследования использовали

свежесрезанные (не более суток до введения в культуру *in vitro*) зелёные побеги растущего дуба черешчатого в период с начала по конец мая 2023 года. Зелёные побеги дуба черешчатого в имматурной фазе онтогенеза из-за своей малочисленности были вынесены в отдельный вариант. Зелёные побеги дуба черешчатого подготавливали аналогично эксперименту 1 (получение жизнеспособных эксплантов на ювенильной фазе онтогенеза).

Дальнейшие операции проводили в условиях ламинар-бокса. Экспланты помещали в 3 % раствор стерилизующего средства Лизоформин 3000. Время экспозиции варьировалось от 3 мин. 30 сек. до 5 мин. с шагом в 30 сек. для черенков, взятых со взрослого растения, и только 5 мин. для частично одревесневших зелёных черенков и имматурных. После этого экспланты во всех вариантах промывали, обрабатывали аскорбиновой кислотой и культивировали аналогично эксперименту 1. Контролем выступал вариант среды по прописи MS [21] с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л.

**Результаты и их обсуждение.** Во всех вариантах эксперимента по введению в культуру зелёных черенков двухмесячных саженцев дуба черешчатого была достигнута высокая стерильность эксплантов – заражение проявилось лишь в одном варианте с показателем 3,57 % (табл. 2).

Большое количество жизнеспособных эксплантов было получено на питательной среде по прописи WPM – от 96,43 до 100 % [22]. Наибольшая доля не жизнеспособных растений приходится на вариант опыта с питательной средой по прописи MS – 22,22 % [21]. Оценить влияние обработки раствором аскорбиновой кислоты эксплантов на жизнеспособность растений не удалось (относительная доля жизнеспособных эксплантов между вариантами на среде WPM отличалась незначительно). Однако в процессе выполнения эксперимента было замечено, что возникновение потемнения эксплантов в варианте с аскорбиновой кислотой значительно замедлялось (до 1 сут. вместо 30–60 секунд после обновления срезов в вариантах без обработки). Возможно, лучших результатов можно было бы достичь при включении аскорбиновой кислоты в состав питательной среды, как в опыте María José Cernadas et al. [3]. После проведения подсчётов (спустя одну неделю культивирования) экспланты переносили на свежую питательную среду и вели культивирование дальше. В результате большинство эксплантов образовали зелёные побеги, а также каллус на местах срезов (рис. 1). Образование каллуса в вариантах опыта с концентрацией бензиламинопурина 1 мг/л также наблюдалось в опыте Quinsheng Li et al. [4].

Таблица 2. Стерилизация ювенильных эксплантов дуба черешчатого при обработке аскорбиновой кислотой

Table 2. Sterilization of juvenile explants of English oak when treated with ascorbic acid

| № | Вариант                                   | Всего эксплантов, шт. | Заражённые экспланты, % | Стерильные экспланты, % |                   |
|---|-------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
|   |                                           |                       |                         | жизнеспособные          | не жизнеспособные |
| 1 | MS 1 БАП, 5 мин., без аск. к-ты, контроль | 27                    | 0                       | 77,78                   | 22,22             |
| 2 | WPM 1 БАП, 5 мин., без аск. к-ты          | 26                    | 0                       | 100                     | 0                 |
| 3 | WPM 1 БАП, 5 мин., с аск. к-той           | 28                    | 3,57                    | 96,43                   | 0                 |

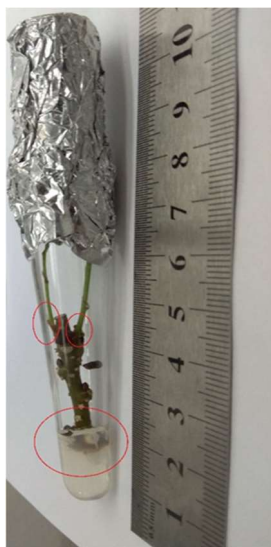


Рис. 1. Эксплант дуба черешчатого спустя месяц культивации, с каллусом на срезе и зелёными побегами

Fig. 1. Explant of English oak after one month of cultivation, with callus at the cut edge and green shoots

В эксперименте по получению жизнеспособных эксплантов дуба черешчатого на имматурной и генеративной фазах онтогенеза были получены данные о влиянии минерального состава питательных сред и экспозиции в стерилизующем средстве Лизоформин 3000 на жизнеспособность эксплантов из зелёных неодревесневших черенков дуба черешчатого (табл. 3). Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на генеративной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от 70,59 до 100 % по сравнению с 50 % на питательной среде по прописи MS. При этом

наибольшее число жизнеспособных стерильных эксплантов получено при использовании экспозиции от 4 мин. 30 сек. (100 %). Схожий результат был получен при стерилизации ювенильного материала в эксперименте В. Г. Краснова и др. [15], где наибольшее число жизнеспособных эксплантов было получено при 4 мин. стерилизации в 3 % растворе лизоформина. Появление доли не стерильных эксплантов в варианте опыта с экспозицией в 5 мин. может быть обусловлено наличием эндогенной инфекции. По вариантам опыта с эксплантами, взятыми с растения в генеративной фазе, проведён корреляционно-регрессионный анализ (рис. 2), результаты дисперсионного анализа приведены в табл. 4. После проведения подсчёта жизнеспособные экспланты переносили на свежую питательную среду и продолжали культивацию, при этом замечено образование побегов (рис. 3). Экспланты, взятые с растения в имматурной фазе онтогенеза, показали 100 % жизнеспособность при выбранном режиме стерилизации, что аналогично таковым показателям при таком же режиме стерилизации и для зелёных неодревесневших черенков, взятых с взрослого растения, и для эксплантов, взятых с саженцев. Высокий показатель заражённости частично одревесневших черенков предположительно обусловлен значительной обсеменённостью исходного материала (рис. 3), поскольку высокие показатели заражённости (48 %)

Таблица 3. Получение жизнеспособных эксплантов дуба черешчатого на имматурной и генеративной фазах онтогенеза при варьируемой экспозиции в лизоформине

Table 3. Obtaining viable explants of English oak at the immature and generative stages of ontogenesis with varying lengths of exposure to Lysoformin

| № | Вариант                          | Всего эксплантов, шт. | Заражённые экспланты, % | Стерильные экспланты, % |                   |
|---|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
|   |                                  |                       |                         | жизнеспособные          | не жизнеспособные |
| 1 | MS 1 БАП, 5 мин., ген., контроль | 28                    | 3,57                    | 50                      | 46,43             |
| 2 | WPM 1 БАП, 5 мин., ген.          | 16                    | 12,5                    | 87,5                    | 0                 |
| 3 | WPM 1 БАП, 4,5 мин., ген.        | 16                    | 0                       | 100                     | 0                 |
| 4 | WPM 1 БАП, 4 мин., ген.          | 20                    | 15                      | 85                      | 0                 |
| 5 | WPM 1 БАП, 3,5 мин., ген.        | 17                    | 29,41                   | 70,59                   | 0                 |
| 6 | WPM 1 Гб, 5 мин., одрев., ген.   | 70                    | 55,71                   | 44,29                   | 0                 |
| 7 | WPM 1 БАП, 5 мин., имм.          | 14                    | 0                       | 100                     | 0                 |

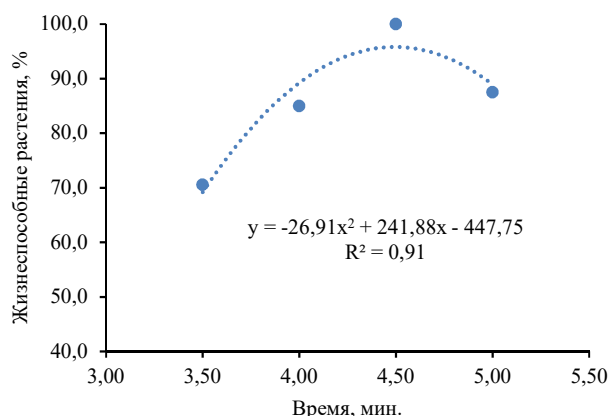


Рис. 2. Влияние экспозиции в стерилизующем растворе на долю жизнеспособных растений

Fig. 2. Effect of exposure to a sterilizing solution on the proportion of viable plants

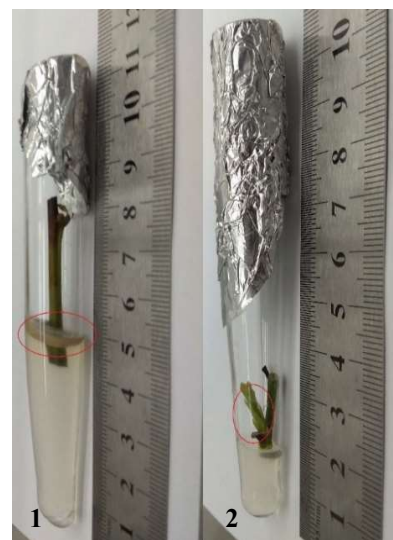


Рис. 3. Заражённый одревесневший эксплант дуба черешчатого (1) и жизнеспособный эксплант дуба черешчатого с зелёным побегом (2) на свежей питательной среде  
Fig. 3. (1) Infected lignified explant of English oak. (2) Viable explant of English oak with a green shoot on fresh nutrient medium

Таблица 4. Влияние режима стерилизации на количество жизнеспособных растений

Table 4. Effect of sterilization regime on the number of viable plants

| Источник вариации  | Сумма квадратов | Число степеней свободы | Средний квадрат | Критерии Фишера |        | Доля влияния, % |
|--------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|
|                    |                 |                        |                 | Ф-расч.         | Ф-таб. |                 |
| Время стерилизации | 13 291,84       | 1                      | 13291,84        | 182,18          | 5,99   | 96,8            |
| Прочие факторы     | 437,76          | 6                      | 72,96           | -               | -      | 3,2             |
| Итого              | 13 729,6        | 7                      |                 | -               | -      | 100             |

биоматериала дуба были обнаружены в опыте Andrea N. Brennan et al. [5], причём эти показатели сильно варьировались не только между видами, но и в пределах одного вида дуба (например, для дуба брусничного 60–92 %).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали, что в  $F_{\text{расч.}}(182,18) > F_{\text{таб.}}=5,99$ , что доказывает достоверность данного суждения. Доля влияния режима стерилизации на количество жизнеспособных эксплантов 96,8 %, а остальные 3,2 % объясняются влиянием других факторов.

**Выводы.** Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на ювенильной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от

96,43 до 100 % [22], в то время как по прописи MS – 77,78 % [21]. Таким образом, среда WPM является лучшим выбором при введении в культуру зелёных черенков дуба черешчатого при выбранном режиме стерилизации. Оценить влияние обработки раствором аскорбиновой кислоты на жизнеспособность растений не удалось.

Наибольшее количество жизнеспособных стерильных эксплантов на генеративной фазе было получено на питательной среде по прописи WPM – от 70,59 до 100 % по сравнению с 50 % на питательной среде по прописи MS. Значительное влияние на количество жизнеспособных стерильных эксплантов оказал режим стерилизации (коэффициент детерминации  $R^2=0,91$ ) и оптимальная экспозиция зелёных черенков

дуба черешчатого в генеративной фазе в 3 % растворе Лизоформина 3000 начинается от 4,5 мин. с показателями жизнеспособности эксплантов от 87,5 до 100 %.

Полученные результаты можно использовать для разработки технологии размножения и выращивания дуба черешчатого *in vitro*.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Калиниченко Н. П. Дубравы России. М.: ВНИИЦлесресурс, 2000. 536 с.
2. Молчанов А. А. Воздействие антропогенных факторов на лес. М.: Наука, 1978. 136 с.
3. Conservation of holm oak (*Quercus ilex*) by *in vitro* culture / M. J. Cernadas, M. T. Martínez, E. Corredoira et al. // *Mediterranean Botany*. 2018. Vol. 39. Iss. 2. Pp. 97–104. DOI: 10.5209/MBOT.60779
4. Li Q., Gu M., Deng M. In Vitro Propagation of Oriental White Oak *Quercus aliena* Blume // *Forests*. 2019. Vol. 10. Iss. 6. Art. 463. DOI: 10.3390/f10060463
5. Tissue Culture Using Mature Material for the Conservation of Oaks / A. N. Brennan, V. C. Pence, M. D. Taylor et al. // *HortTechnology*. 2017. Vol. 27. Iss. 5. Pp. 644–649. DOI: 10.21273/HORTTECH03801-17
6. Зайцева Ю. Г., Новикова Т. И. Клональное микроразмножение *Rhododendron dauricum* // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2014. Т. 12. № 1. С. 26–31. EDN: RXMKAN
7. The effect of Plantform™ bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the micro-environment influence on leaf structure / E. Gatti, E. Sgarbi, E. A. Ozudogru et al. // *Plant Biosystems*. 2017. Vol. 151. Iss. 6. Pp. 1129–1136. DOI: 10.1080/11263504.2017.1340356
8. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
9. Бутова Г. П., Скробова Л. Л. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* // *Физиология растений*. 1988. Т. 35. № 5. С. 1023–1030.
10. Бутова Г. П. Экспериментальные предпосылки для клонального микроразмножения дуба черешчатого // *Биология культивируемых клеток и биотехнология: международная конференция, Новосибирск, 2–6 августа 1988. Тезисы докладов в 2-х ч.* Новосибирск: ИЦИГ, 1988. С. 366.
11. Белоус В. И. Новый способ прививки дуба и других лиственных пород // *Лесохозяйственная информация*. 1971. № 4. 14 с.
12. Белоус В. И. Районирование клоновых лесосеменных плантаций дуба на Украине // *Лесохозяйственная информация*. 1973. № 20. 8 с.
13. Белоус С. Ю., Коломиец Ю. Биотехнологические аспекты введения в культуру *in vitro* Дуба Максима Зализняка // *Материалы междунар. науч. конференции к 75-летию Национального ботанического сада им. Гришко НАН Украины: Интродукция растений и обогащения биоразнообразия в ботанических садах и дендропарках* (Киев, 15-17 сентября 2010). Киев: «Академперіодика» НАН України, 2010. С. 583–585.
14. Марчук А. А., Кирилюк В. И. Сохранение и размножение ценных генотипов *in vitro* // *Научные доклады НАУ*. 2008. № 4 (12) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.nbuv.gov.ua/e-journals/nd/2008-4/08moogiv.pdf> (дата обращения: 05.10.2023).
15. Разработка режима стерилизации взрослого и ювенильного биоматериала дуба черешчатого (*Quercus Robur* L.) для введения в культуру тканей / В. Г. Краснов, Р. В. Сергеев, Е. М. Романов и др. // *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование*. 2021. № 1 (49). С. 94–103. DOI: 10.25686/2306-2827.2021.1.94; EDN: HBLLMU
16. Vengadesan G., Pijut P. M. In vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.) // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2009. Vol. 45. Iss. 4. Pp. 474–482. DOI: 10.1007/s11627-008-9182-6
17. Gatti E., Sgarbi E. Micropropagation of *Quercus robur*: explant sources and cultural conditions affect *in vitro* responses differently // *ISHS Acta Horticulturae 1083: VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. 2015. Vol. 1083. Art. 38. Pp. 303–310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.38
18. Cívínová D., Sladký Z. A study of the regeneration capacity of oak (*Quercus robur* L.) // *Scripta Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis J. E. Purkynianae Brunensis. Biologia*. 1987. Vol. 17. No 3–4. Pp. 103–110.
19. Grigorescu A., Iordan M., Enescu V. Aspecte privind acomodarea la conditii septice a plantelor de stejar (*Quercus robur* L.) regenerate prin culturi "in vitro" // *Revista pădurilor. Silvicultură și exploatarea pădurilor*. 1987. Vol. 102. No 1. Pp. 19–22.
20. Гусева О. Ю., Стародубцева Л. М., Попов В. Н. Получение морфогенных культур *in vitro* дуба черешчатого с использованием эксплантов из ювенильного и взрослого материала // *Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства*. 2018. № 2. С. 18–29. DOI: 10.21178/2079-6080.2018.2.18; EDN: VLPNDX

21. *Murashige T., Skoog F.* A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. Iss. 3. Pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

22. *Lloyd G. B., McCown B. H.* Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society*. 1980. Vol. 30. Pp. 421–427.

Статья поступила в редакцию 17.10.2023; одобрена после рецензирования 19.12.2023; принята к публикации 25.12.2023

### Информация об авторах

**ТИМАКОВ Алексей Александрович** – аспирант кафедры лесных культур, селекции и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – биотехнология растений. Автор десяти научных публикаций. SPIN-код: 6306-1287

**СЕРГЕЕВ Роман Владимирович** – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесных культур, селекции и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – лесная биотехнология. Автор 50 научных публикаций. SPIN-код: 1479-7956

**РОМАНОВ Евгений Михайлович** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры лесных культур, селекции и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – выращивание лесопосадочного материала, искусственное лесовосстановление, утилизация органических отходов, управление лесным хозяйством. Автор 212 научных публикаций. SPIN-код: 8291-5546

**ХУСАИНОВА Алия Ренатовна** – аспирант, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева. Область научных интересов – биотехнология растений. Автор 17 научных публикаций. SPIN-код: 2342-8951

**КРАСНОВ Виталий Геннадьевич** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры лесных культур, селекции и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – искусственное лесовыращивание, восстановление дубрав, выращивание посадочного материала. Автор 160 научных публикаций. SPIN-код: 3179-8907

### Вклад авторов:

**Тимаков А. А.** – методология исследования, проведение экспериментов, анализ полученных результатов, подготовка исходного текста.

**Сергеев Р. В.** – редактирование текста, научная консультация.

**Романов Е. М.** – научное руководство, научная консультация.

**Хусаинова А. Р.** – подготовка исследования (приготовление питательных сред), информационный поиск.

**Краснов В. Г.** – редактирование текста, проведение статистического анализа, окончательное утверждение версии для публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.



Scientific article

UDC 630\*52:630\*174.754

<https://doi.org/10.25686/2306-2827.2024.1.55>

EDN: DEMOOK

### In vitro Culture Initiation of Green Cuttings of English Oak (*Quercus robur* L.) of Different Age Groups

A. A. Timakov<sup>1✉</sup>, R. V. Sergeev<sup>1</sup>, E. M. Romanov<sup>1</sup>, A. R. Khusainova<sup>2</sup>, V. G. Krasnov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volga State University of Technology,

3, Lenin Sq., Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,  
49, Timiryazevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation

TimakovAA@volgatech.net✉

#### ABSTRACT

**Introduction.** English oak (*Quercus robur* L.) is the main forest-forming species of oak forests. The low efficiency of conventional propagation of English oak in the context of the overall decrease in the productivity of oak forests is a problem for the whole world and Russia in particular. The issue can be addressed through the use of modern in vitro tissue culture methods. **The purpose of the study** is to develop a method for obtaining primary oak explants from green cuttings. **The objectives** of the work are to (1) assess the influence of the mineral composition of the nutrient medium and the treatment of explants with ascorbic acid on the effectiveness of the introduction of oak explants of different age groups, and (2) determine the effect of the nutrient medium and sterilization regime on English oak explants at the juvenile, immature and generative stages of development. **Materials and methods.** The objects of the study were English oak cuttings of different age groups including the juvenile, immature and generative ones. The research methods were based on the generally accepted, classical techniques of working with cultures of isolated plant tissues and organs. As a result, viable explants of English oak were obtained, and correlation-regression and variance analyses were carried out. **Results.** A large number of viable juvenile explants was obtained on a nutrient medium prepared according to the Woody Pant Medium (WPM) recipe (from 96.43% to 100%). The largest percentage of non-viable juvenile explants was recorded in the experimental option employing a nutrient medium composed according to the Murashige and Skoog (MS) medium recipe (22.22%). The maximum number of viable sterile explants at the generative phase was obtained on the WPM medium (from 70.59% to 100%). Moreover, the largest number of viable sterile explants was recorded when using the exposure to a sterilizing agent for a period of 4.5 minutes or more. **Conclusions.** The greatest yield of viable sterile explants at the juvenile phase was observed when using a nutrient medium formulated according to the WPM recipe (96.43% to 100%), while their share on a medium based on the MS medium composition was 77.78%. Thus, WPM is the best choice for the introduction of green cuttings of English oak to in vitro culture under the selected sterilization regime. The largest number of viable sterile explants at the generative phase was obtained on the nutrient medium formulated according to the WPM recipe (from 70.59% to 100%), compared to 50% of those cultured on the nutrient medium according to the MS medium composition. The sterilization regime had a significant impact on the number of viable sterile explants. The optimal time of exposure of English oak green cuttings at the generative phase to a 3% solution of Lysoformin 3000 starts from 4.5 minutes, with the explant viability rates ranging from 87.5% to 100%. The results obtained can be used to develop a technology for propagating and growing *Quercus robur* L. in vitro.

**Keywords:** explant; surface sterilization; nutrient medium; clonal micropropagation

#### REFERENCES

1. Kalinichenko N. P. Oak forests of Russia. Moscow: VNIITslesresurs, 2000. 536 p. (In Russ.).
2. Molchanov A. A. Impact of anthropogenic factors on the forest. Moscow: Nauka, 1978. 136 p. (In Russ.).
3. Cernadas M. J., Martínez M. T., Corredoira E. et al. Conservation of holm oak (*Quercus ilex*) by in vitro culture. *Mediterranean Botany*. 2018. Vol. 39. Iss. 2. Pp. 97–104. DOI: 10.5209/MBOT.60779
4. Li Q., Gu M., Deng M. In Vitro Propagation of Oriental White Oak *Quercus aliena* Blume. *Forests*. 2019. Vol. 10. Iss. 6. Art. 463. DOI: 10.3390/f10060463
5. Brennan A. N., Pence V., Taylor M. D. et al. Tissue Culture Using Mature Material for the Conser-

vation of Oaks. *HortTechnology*. 2017. Vol. 27. Iss. 5. Pp. 644–649. DOI: 10.21273/HORTTECH03801-17

6. Zaytseva Yu. G., Novikova T. I. Clonal micropropagation of *Rhododendron dauricum*. *Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine*. 2014. Vol. 12. Iss. 1. Pp. 26–32. EDN: RXMKAH (In Russ.).

7. Gatti E., Sgarb E., Aylin E. et al. The effect of Plantform™ bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. *Plant Biosystems*. 2017. Vol. 151. Iss. 6. Pp. 1129–1136. DOI: 10.1080/11263504.2017.1340356

8. Butenko R. G. Biology of cells of higher plants *in vitro* and biotechnologies on their basis. Moscow: FBK-PRESS, 1999. 160 p. (In Russ.).

9. Butova G. P., Skrobova L. L. Morphogenesis and recovery of English oak *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1988. Vol. 35. Iss. 5. Pp. 1023–1030. (In Russ.).

10. Butova G. P. Experimental prerequisites for clonal micropropagation of English oak. *Biology of Cultured Cells and Biotechnology: abstracts of papers of the International conference; Novosibirsk, 2-6 August 1988. In 2 parts*. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SB USSR AS, 1988. P. 366 (In Russ.).

11. Belous V. I. A novel method of inoculation of oak and other hardwood species. *Forestry Information*. 1971. No 4. 14 p. (In Russ.).

12. Belous V. I. Zoning of the clonal seed plantations of oak in the Ukraine. *Forestry Information*. 1973. No 20. 8 p. (In Russ.).

13. Bilous S., Kolomiets Iu. Biotechnological aspects for introduction *in vitro* of Maksim Zaliznyak oak. *Proceeding of International conference dedicated to the 75th anniversary of M. M. Gryshko National Botanic Garden of NASU: Introduction of plants and biodiversity enrichment in botanical gardens and dendrological parks (Kyiv, September, 15–17 2010)*. Kyiv: "Akadempriodika" NAS of Ukraine, 2010. Pp. 583–585. (In Ukr.).

14. Marchuk A. A., Kiriliuk V. I. Preservation and propagation of valuable genotypes *in vitro*. *Scientific Reports of NAS*. 2008. No 4 (12). URL: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/nd/2008-4/08mogiv.pdf> (reference date: 05.10.2023). (In Russ.).

15. Krasnov V. G., Sergeev R. V., Romanov E. M. et al. Elaboration of the Regime for Sterilization of Adult and Juvenile Biomaterial of English Oak (*Quercus Robur* L.) for Introduction *in vitro*. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2021. No 1 (49). Pp. 94–103. DOI: <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2021.1.94>; EDN: HBLLMU (In Russ.).

16. Vengadesan G., Pijut R. M. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2009. Vol. 45. Iss. 4. Pp. 474–482. DOI: 10.1007/s11627-008-9182-6

17. Gatti E., Sgarbi E. Micropropagation of *Quercus robur*: explant sources and cultural conditions affect *in vitro* responses differently. *ISHS Acta Horticulturae 1083: VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. 2015. Vol. 1083. Art. 38. Pp. 303–310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.38

18. Civinová D., Sladký Z. A study of the regeneration capacity of oak (*Quercus robur* L.). *Scripta Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis J. E. Purkynianae Brunensis. Biologia*. 1987. Vol. 17. No 3–4. Pp. 103–110.

19. Grigorescu A., Iordan M., Enescu V. Aspecte privind acomodarea la conditii septice a plantelor de stejar (*Quercus robur* L.) regenerate prin culturi "in vitro". *Revista pădurilor. Silvicultură și exploatarea pădurilor*. 1987. Vol. 102. No 1. Pp. 19–22. (In Roman.)

20. Guseva O. Yu., Starodubtseva L. M., Popov V. N. Obtaining morphogenic cultures *in vitro* of pedunculate oak using explants from juvenile and adult material. *Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute*. 2018. No. 2. Pp. 18–29. DOI: 10.21178/2079-6080.2018.2.18; EDN: VLPNDX (In Russ.).

21. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. Iss. 3. Pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

22. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*. 1980. Vol. 30. Pp. 421–427.

The article was submitted 17.10.2023; approved after reviewing 19.12.2023; accepted for publication 25.12.2023

**For citation:** Timakov A. A., Sergeev R. V., Romanov E. M., Khusainova A. R., Krasnov V. G. *In vitro* Culture Initiation of Green Cuttings of English Oak (*Quercus Robur* L.) of Different Age Groups. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2024. № 1 (61). Pp. 55–65. (In Russ.). <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2024.1.55>; EDN: DEMOOK

### Information about the authors

*Aleksey A. Timakov* – Postgraduate student, Department of Forest Plantations, Selection and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – plant biotechnology. Author of ten scientific publications. SPIN: 6306-1287

*Roman V. Sergeev* – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor, Department of Forest Plantations, Selection and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – forest biotechnology. Author of 50 scientific publications. SPIN: 1479-7956

*Evgeny M. Romanov* – Doctor of Agricultural Sciences, Professor at the Department of Forest Plantations, Selection and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – cultivation of forest planting material, artificial reforestation, recycling of organic waste, forest management. Author of 212 scientific publications. SPIN: 8291-5546

*Aliya R. Khusainova* – Graduate Student, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Research interests – plant biotechnology. Author of 17 scientific publications. SPIN: 2342-8951

*Vitaly G. Krasnov* – Doctor of Agricultural Sciences, Professor at the Department of Forest Plantations, Selection, and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – artificial reforestation, restoration of oak forests, cultivation of forest planting material. Author of 160 scientific publications. SPIN: 3179-8907

### Contribution of the authors:

*Timakov A. A.* – research methodology development, performing the experiments, analysis of the results obtained, preparation of the initial draft.

*Sergeev R. V.* – reviewing and editing, scientific guidance.

*Romanov E. M.* – research supervision, scientific guidance.

*Khusainova A. R.* – research process preparation (preparation of nutrient media), information search.

*Krasnov V. G.* – reviewing and editing, statistical analysis, approval of the final version of the manuscript for publication.

The authors declare that they have no conflict of interest.

All authors read and approved the final manuscript.