DOI 10.21178/2079-6080.2018.2.18
УДК 57.085.23

Получение морфогенных культур *in vitro* дуба черешчатого с использованием эксплантов из ювенильного и взрослого материала

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

Obtaining morphogenic cultures of English oak *in vitro* using explants of juvenile and adult material

O.Yu. Guseva, L.M. Starodubtseva, V.N. Popov (Federal State Budget Institution «Russian Research Institute of Forest Genetics, Selection and Biotechnology»; Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Voronezh State University»)

There has been carried out the work on the microclonal reproduction of oak stems of different age material. For introduction into culture *in vitro*, one-month and four-month seedlings were used as well as shoots of 5 and 80-year-old trees obtained by forcing of latent buds in the laboratory (March and April) or directly taken from a tree during the growing season (May). As the primary explants, there were stem segments with 1–2 axillary buds. In the process, optimal regimes of sterilization of microcrops (up to 92–100 % of aseptic cultures) were determined, the conditions for induction of shoots for all types of explants in use were revealed. *In vitro* cultures differed in the viability and parameters of morphogenesis depending on the frequency of transplantation, the composition of the nutrient medium, and the age of the original plants. We learned that the mineral composition of the BTM nutrient medium with the addition of 6-benzylaminopurine at low concentrations was the most appropriate for initiating of the main shoot (58–88 %). The increase in the content of this hormone in the medium led to an adventive shoot formation which was more common in juvenile cultures. It was noted that most nodal segments retained their viability by subculturing on fresh nutrient media every two weeks. Within each age group, the highest growth rates were observed in oak explants introduced into the culture *in vitro* in the second half of May (during the active vegetation period). The technique for obtaining viable morphogenic cultures for adult trees has been developed that can be widely used in forestry with the aim of preserving a valuable gene pool.

Key words: English oak, *Quercus robur* L., *in vitro*, microclonal propagation, microcrops, morphogenesis

Получение морфогенных культур *in vitro* дуба черешчатого с использованием эксплантов из ювенильного и взрослого материала

О.Ю. Гусева, Л.М. Стародубцева, В.Н. Попов

Проведена работа по микроклональному размножению дуба черешчатого из разного возрастного материала. Для введения в культуру *in vitro* использовали одномесячные и четырехмесячные сеянцы, а также побеги 5- и 80-летних деревьев, полученные выгонкой из спящих почек в лаборатории (март и апрель), либо взятые непосредственно с дерева в период вегетации (май). Первичными эксплантами служили стеблевые сегменты с 1–2 пазушными почками. В ходе работы были определены оптимальные режимы стерилизации микрочеренков (с получением до 92–100 % асептических культур), выявлены условия индукции побегов для всех видов использованных эксплантов. Культуры *in vitro* различались по жизнеспособности и параметрам морфогенеза в зависимости от частоты пересадок, состава питательной среды и возраста исходных растений. Наиболее подходящим для инициации основного побега оказался минеральный состав питательной среды ВТМ с добавлением 6-бензиламинопурина в низких концентрациях (58–88 %). Увеличение содержания данного гормона в среде приводило к адвентивному побегообразованию, которое чаще встречалось у ювенильных культур. Отмечено, что большинство узловых сегментов сохраняли свою жизнеспособность при субкультивировании на свежие питательные среды каждые две недели. В пределах каждой возрастной группы наиболее высокие показатели роста наблюдались у эксплантов дуба, введенных в культуру *in vitro* во второй половине мая (в период активной вегетации). Отработана методика получения жизнеспособных морфогенных культур для взрослых деревьев, что может найти широкое применение в лесном хозяйстве с целью сохранения ценного генофонда.

Ключевые слова: дуб черешчатый, *in vitro*, микроклональное размножение, микрочеренки, морфогенез

Гусева Оксана Юрьевна — младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
E-mail: guseva.oks2017@yandex.ru

Стародубцева Людмила Михайловна — научный сотрудник лаборатории семеноводства

Попов Василий Николаевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии

¹ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

394087, Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105

Телефон: 8(473) 253 71 89

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

Телефон: 8 (473) 220 88 52

Введение

Дуб черешчатый — основа дубрав средне-русской лесостепи, играет важную ландшафтно-экологическую роль в Центральном Черноземье. Эти деревья переносят широкий диапазон почвенных условий, их древесина ценится не только за прочность, но и за декоративность, имеет ярко выраженный рисунок ростовых колец [24]. Из 27 видов европейских дубов *Quercus robur* L. относится к наиболее экономически значимым [23]. Цена древесины дуба на международном рынке растет и превосходит стоимость даже редких экзотических пород.

Однако за последний полувековой период усыхание и деградация дубрав в регионах лесостепи приобрели катастрофические масштабы, что грозит полным исчезновением данной породы из состава лесных насаждений. Дуб не выдерживает конкуренции с другими сопутствующими широколиственными видами (ясенем, кленом, липой, вязом, лещиной). Многие представители рода *Quercus* испытывают влияние биотических (нападение вредителей), антропогенных (интенсивные рубки) и климатических (весенние заморозки и летние засухи) факторов [21]. Вегетативное размножение трудоемко, часто происходит отторжение привоя. С увеличением возраста дерева возможность черенкования уменьшается [3, 8].

Перед учеными особо остро стоит задача поиска новых ресурсов (помимо традиционных способов) восстановления дуба как одной из основных лесообразующих пород. В последнее время активно разрабатываются меры по возобновлению дубрав [6, 7, 10]. На сегодняшний день селекция дуба осуществляется в основном на уровне популяций и семейств. Традиционное вегетативное размножение отдельных плюсовых деревьев связано с определенными трудностями при черенковании. В связи с этим особо актуальным становится применение биотехнологических подходов для сохранения и воспроизводства ценных объектов. Одним из таких методов является

клонирование *in vitro*, который может применяться с целью размножения взрослых деревьев с известным генотипом [8], а также для получения оздоровленного посадочного материала в короткие сроки [13].

Огромный вклад в разработку методики культивирования *in vitro* дуба внесли чешский биолог V. Chalupa [13–16, 24], а также испанские ученые [17, 22, 25]. Большого внимания заслуживают исследования российских биотехнологов: Л.В. Филимоновой (Волгоград), Г.П. Бутовой, М.Ю. Нечаевой, Н.А. Карпеченко (Институт лесной генетики, Воронеж), О.К. Баркаловой (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток) [1–3, 9]. В нашей стране введение в культуру дуба проводили в основном на ювенильном материале (сеянцы, проростки желудей) [3, 9]. Также в данном направлении работали на Украине [12], в Беларуси [4, 5] и Болгарии [11].

Особенно интересны работы, посвященные клонированию взрослых деревьев, так как в данном случае размножается генотип с известными признаками исходного материнского растения [23]. В своей работе мы использовали экспланты сеянцев (как модельный объект) и 80-летних деревьев дуба черешчатого. Культивирование *in vitro* с использованием ювенильного материала дает широкие возможности для получения новых форм и отбора устойчивых линий. Кроме того, отработка методики микроразмножения на ювенильном материале является важным подготовительным этапом для успешного клонирования зрелых плодоносящих деревьев. Клональное микроразмножение взрослых деревьев дуба до сих пор остается проблематичным (из-за повышенного содержания эндогенной инфекции, наличия фенолов, низкой регенерационной способности) [4]. Некоторые из вышеперечисленных трудностей нам удалось преодолеть.

Объекты и методы

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* дуба черешчатого служили:

- 1) сеянцы в возрасте 1 и 4 месяцев;

2) зеленые побеги, полученные путем выгонки из спящих почек 5-летних и 80-летних деревьев (корневая и стволовая поросль);

3) растущие зеленые побеги текущего вегетационного периода, срезанные непосредственно с 80-летнего дерева (стволовая поросль).

Получение сеянцев. Сеянцы были выращены из желудей популяционного сбора в Бутурлиновском районе, предоставленных В.А. Кострикиным. Крупные неповрежденные плоды предварительно замачивали на сутки в талой снеговой воде (в декабре). Затем желуды помещали в контейнеры с увлажненным субстратом из нейтрального торфа на глубину 3–4 см.

Выгонка побегов с 5-летних и 80-летних деревьев. Выгонку зеленых пазушных побегов проводили по методу, описанному испанскими учеными для 6–7-летних деревьев *Q. alba* L. (дуба белого), *Q. bicolor* Willd. (дуба двуцветного) и *Q. rubra* L. (дуба красного) [18]. В наших исследованиях растительный материал заготавливали в марте-апреле 2016–2017 гг. с 5-летних и 80-летних деревьев дуба черешчатого, свободно произрастающих в лесопарковом участке Правобережного лесничества. Ветви для выгонки нарезали на сегменты длиной 12–20 см. Полученные черенки ставили вертикально в увлажненный субстрат. Активацию спящих почек стимулировали в микротеплицах с пленочным покрытием при температуре +25 °С и влажности 80–90 %, в условиях 12-часового фотопериода. Через 14–18 дней полученные побеги были использованы в качестве первичных эксплантов для микроклонального размножения.

Побеги 80-летнего дерева текущего вегетационного периода. Во второй декаде мая со стволовой поросли были срезаны зеленые растущие побеги (длиной 6–12 см), которые были расчерекованы и введены в культуру *in vitro*.

Стерилизация разновозрастного растительного материала дуба черешчатого и его введение в культуру *in vitro*. Предварительно с

эксплантов были срезаны крупные листья. Для более эффективной асептики все побеги длиной более 10 см были поделены на 2 части и погружены в мыльную воду на 3 мин. Затем экспланты помещали на 7 минут в 0,02 % раствор моющего средства «Domestos», после чего тщательно промывали в проточной воде в течение 10 минут. Дальнейшая обработка растительного материала проводилась в стерильных условиях ламинар-бокса с помощью 0,02 % раствора мертиолята (8–15 мин), либо моющего средства «Белизна» (10 мин). Затем растения промывали 4 раза по 5 минут стерильной дистиллированной водой. Расчерекованные в чашках Петри экспланты с 1–2 узлами помещали по одному в биологические пробирки с питательной средой и культивировали в климатической комнате при температуре +25 °С, 16-часовом фотопериоде (2000 люкс).

На стадии инициации побегов для эксплантов сеянцев применяли различные питательные среды: ВТМ [13] с добавлением БАП 0,2 и 0,5 мг/л; WPM [19] с БАП 0,4 и 1 мг/л; MS [20] с БАП 0,2 и 0,5 мг/л. Пятилетние сегменты культивировались на средах ВТМ и WPM с БАП 0,2 мг/л. Для взрослых деревьев выбор минерального и гормонального состава среды был сделан на основании лучших показателей, полученных нами в опытах с ювенильным материалом (ВТМ с концентрацией БАП 0,2 мг/л).

Результаты и их обсуждение

Получение асептических культур дуба черешчатого. Количество жизнеспособных асептических эксплантов среди сеянцев и побегов с 5-летних и 80-летних деревьев при использовании 0,02 % раствора мертиолята составило 80–100 %. Стерилизация раствором «Белизна» оказалась не подходящей для растительного материала, полученного выгонкой (50 % асептических культур), но успешной для сеянцев и эксплантов, взятых непосредственно с дерева (88–100 %). Побеги, полученные в микротеплицах при высокой влажности, содер-

жали много экзогенной инфекции и требовали более жесткой обработки мертиолятом, что позволило получить в среднем 92,0 % чистых жизнеспособных эксплантов (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность стерилизации эксплантов дуба черешчатого

Вид экспланта	Режим стерилизации	Количество эксплантов, шт.	Количество асептических культур, %		Количество инфицир. культур, %
			жизнеспособных	нежизнеспособных	
1-месячные сеянцы	0,02 % р-р мертиолята, 10 мин	160	92,8±0,6**	4,4±0,6	2,8±0,6
	«Белизна» + вода (1:1), 10 мин	24	88,0±0,3**	8,0±0,2	4,0±0,1
4-месячные сеянцы	0,02 % р-р мертиолята, 10 мин	42	100,0±0,0	-	-
Побеги с 5-летнего дерева(выгонка)	0,02 % р-р мертиолята, 8 мин	20	85,0±0,4**	15,0±0,4	-
	0,02 % р-р мертиолята, 10 мин	35	94,0±0,1**	6,0±1,6	-
	0,02 % р-р мертиолята, 15 мин	10	80,0±1,2*	20,0±1,2	-
Побеги с 80-летнего дерева(выгонка)	0,02 % р-р мертиолята, 10 мин	24	92,0±0,2**	8,0±0,2	-
	«Белизна» + вода (1:1), 10 мин	10	40,0±3,5	10,0±0,6	50,0±2,9
Растущие побеги с 80-летнего дерева	0,02 % р-р мертиолята, 10 мин	20	100,0±0,0	-	-
	«Белизна» + вода (1:1), 10 мин	20	100,0±0,0	-	-

Примечание. Различия между эксплантами, полученными выгонкой побегов от 80-летнего дерева, по количеству жизнеспособных асептических культур более существенны в сравнении с остальными вариантами при: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Инициация побегообразования. Через неделю культивирования у первичных микрочеренков наблюдалось набухание пазушных

почек, а через 3–4 недели развивались побеги длиной 9,4–14,3 мм у одномосячных и 15 мм у четырехмесячных сеянцев (рис. 1).

Рис. 1. Первичные экспланты сеянцев дуба через неделю (а) и месяц (б) культивирования на среде ВТМ с 0,2 БАП

Самая высокая морфогенетическая активность (способность образовывать основной побег) была получена среди эксплантов одномесячных и четырехмесячных сеянцев на среде ВТМ, дополненной БАП 0,2 мг/л (67,0 %), самая низкая – с 1,0 мг/л БАП (24,0 %). Также отмечено, что при низких концентрациях БАП экспланты сеянцев на средах WPM и ВТМ образовывали побег несколько активнее, чем на MS (рис. 2). При повышенном содержании

цитокинина (0,5–1,0 мг/л) рост пазушных побегов в длину значительно тормозился, но при этом появлялось множество коротких дополнительных (табл. 2, рис. 3). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными [13]. Сегменты побегов 5-летних деревьев на средах ВТМ и WPM с БАП 0,2 мг/л образовали примерно одинаковое количество культур с основными побегами – 58,0 и 57 % соответственно (табл. 2).

Рис. 2. Энергия роста побегов у эксплантов сеянцев в зависимости от концентрации цитокинина 6-БАП в питательной среде

Таблица 2

Эффективность морфогенеза эксплантов дуба черешчатого через месяц культивирования на питательных средах различного минерального и гормонального состава

Вид экспланта	Состав питательной среды	Количество эксплантов, шт.	Морфогенные культуры		
			Всего, шт.	С пазушными почками и побегами, %	С пазушными и адвентивными почками и побегами, %
1-месячные сеянцы	BTM+6-БАП 0,2 мг/л	27	18	67,0±1,1***	33,0±1,1
	BTM+6-БАП 0,5 мг/л	29	21	43,0±1,6**	57,0±1,6
	WPM+6-БАП 0,4 мг/л	23	23	30,0±1,7*	70,0±1,7
	WPM+6-БАП 1 мг/л	25	21	24,0±2,1	76,0±2,1
	MS+6-БАП 0,2 мг/л	35	33	58,0±0,7***	42,0±0,7
	MS+6-БАП 0,5 мг/л	32	24	37,0±1,5**	63,0±1,5
4-месячные сеянцы	BTM+6-БАП 0,2 мг/л	42	38	66,0±0,5***	34,0±0,5
Побеги с 5-летнего дерева (выгонка)	BTM+6-БАП 0,2 мг/л	30	24	58,0±1,0***	42,0±1,0
	WPM+6-БАП 0,2 мг/л	28	14	57,0±1,8***	43,0±1,8
Побеги с 80-летнего дерева (выгонка)	BTM+6-БАП 0,2 мг/л	29	26	88,0±0,3	12,0±0,3
Растущие побеги с 80-летнего дерева	BTM+6-БАП 0,2 мг/л	40	24	75,0±0,6***	25,0±0,6

Примечание. Различия между эксплантами сеянцев, а также между эксплантами деревьев достоверны при: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Рис. 3. Адвентивные побеги у эксплантов сеянцев (*a*) и взрослых деревьев (*б*) дуба черешчатого

Большинство эксплантов из побегов 80-летних деревьев развивали основные побеги — 75,0–88,0 % (рис. 4), в то время как адвентивные встречались всего у 12,0–25,0 %

культур — в отличие от ювенильных микрочеренков, где при той же концентрации БАП дополнительные побеги образовывались в 33,0–42 % случаев (см. табл. 2, рис. 3).

Рис. 4. Инициация побегообразования у 80-летних эксплантов дуба черешчатого

Отмечено, что на жизнеспособность эксплантов также влияет частота их пассажей. При переносе растений на свежие питательные среды каждые две недели количество культур с развитыми основными побегами ко второму месяцу культивирования составляло 70 %, каждые три недели — всего 41 % (из них с побегами — 36 %). При более редких пересадках (раз в месяц) к восьмой неделе культивирования все экспланты погибали.

Результаты исследования показали, что все культуры, полученные с помощью выгонки в лаборатории (как 5-летние, так и 80-летние), обладали слабой энергией роста (средняя длина основного побега через месяц культивирования составляла 10 мм) по сравнению с эксплантами, взятыми непосредственно с дерева в период активной вегетации, у которых длина побега равнялась 17 мм (рис. 5).

Рис. 5. Активность морфогенеза культур дуба черешчатого в зависимости от вида экспланта на питательной среде ВТМ+6-БАП 0,2 мг/л

Результаты данной поисковой работы подтвердили возможность эффективного микроклонального размножения дуба черешчатого, что не исключает дальнейшей оптимизации и доработки отдельных этапов.

Выводы

В результате проведенной работы получены асептические морфогенные культуры для эксплантов из семян дуба черешчатого, а также из побегов с деревьев 5-летнего и 80-летнего возраста. Подобраны режимы стерилизации, которые оказались одинаково эффективными для ювенильного и взрослого материала. Отмечено, что обработка растений 0,02 % раствором мертиолята в течение 10 минут достаточна для получения 92–100 % асептических жизнеспособных культур.

Показана значительная зависимость способности эксплантов к органогенезу от условий культивирования, возраста исходных растений, а также от времени эксплантирова-

ния. Установлено, что жизнеспособность микрочеренков по мере увеличения периода между пассажами резко снижается. Наиболее оптимальная частота субкультивирования — раз в две недели. В пределах каждой возрастной группы самая высокая морфогенетическая активность наблюдалась у эксплантов дуба, введенных в культуру *in vitro* во второй половине мая. Наиболее подходящими для индукции и развития основного побега являются питательные среды ВТМ и WPM, дополненные 6-БАП в концентрациях 0,2–0,4 мг/л, а для множественного адвентивного побегообразования — с повышенным содержанием 6-БАП (0,5–1 мг/л). Пролиферация дополнительных почек более активно проходила у ювенильных эксплантов.

Целесообразно продолжать исследования по мультипликации полученных микропобегов с целью увеличения численности клона, а также по определению оптимальных условий их ризогенеза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеева, Л.А. Роль генотипа при размножении дуба черешчатого и сосны обыкновенной методом культуры тканей / Л.А. Алексеева, М.Ю. Нечаева, Г.П. Бутова // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж, 1993. – С. 65–73.
2. Баркалова, О.К. Результаты экспериментов по микроклональному размножению дуба монгольского (*Quercus mongolica* Fich. ex Ledeb.) / О.К. Баркалова, Е.А. Бисикалова, Т.П. Орехова // Аграрный вестник Приморья. – 2016. – № 4 (4). – С. 41–44.
3. Бутова, Г.П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г.П. Бутова, Л.Л. Скрובה // Физиология растений. – 1988. – Том 35, № 5. – С. 1023–1030.
4. Концевая, И.И. Определение условий введения дуба черешчатого в культуру *in vitro* / И.И. Концевая // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: мат. межд. науч. конф. 3–6 декабря. – Минск, 2008. – С. 103–105.
5. Кулагин, Д.В. Биотехнологические аспекты рационального использования генетических ресурсов дуба черешчатого Беларуси / Д.В. Кулагин // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: мат. 3-го межд. сов. 23–29 августа. – Красноярск, 2011. – С. 84–85.
6. Миронов, Д.С. Экология ложного дубового трутовика (*Phellinus robustus* Bourd et Yaloz) в связи с проблемой деградации дубрав Центрального Черноземья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Миронов Дмитрий Сергеевич; ВГУ. – Воронеж, 2008. – 23 с.
7. Михно, В.Б. Ландшафтный аспект произрастания, дифференциации и структурной организации дубрав среднерусской лесостепи / В.Б. Михно // Вестник ВГУ. – 2014. – № 1. – С. 9–17.

8. Семенова, В.А. Разработка методики микроклонального размножения взрослых плюсовых деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) с применением методов биотехнологии и молекулярно-генетического анализа / В.А. Семенова, Н.А. Карпеченко, К.А. Карпеченко // Молодые ученые – лесному хозяйству страны: сб. ст. научно-практической конференции. – Пушкино, 2012. – С. 47–52.
9. Филимонова, Л.В. Размножение дуба черешчатого пирамидальной формы для защитного лесоразведения в Нижнем Поволжье: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.03.04 / Филимонова Людмила Викторовна; ВНИАЛМИ. – Волгоград, 1999. – 23 с.
10. Харченко, Н.А. К вопросу о деградации порослевых дубрав Центрального Черноземья / Н.А. Харченко, Н.Н. Харченко // Лесной вестник. – 2007. – № 4. – С. 29–31.
11. Цветков И. Възможности за *in vitro* регенерация на растения от зародиши и ювенилни фиданки на летен дъб (*Quercus robur* L.) / И. Цветков, А. Атанасов // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 1992. – Vol. 6, No. 3. – С. 13–18.
12. Bilous S.Yu. Biotechnological aspects of reproduction of centuries-old oak Maksim Zaliznak in the *in vitro* culture / S.Yu. Bilous // Лісове і садово-паркове господарство. – 2012. – No. 2. – P. 25–34.
13. Chalupa V. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) / V. Chalupa // Biol. Plant. – 1984. – No. 26. – P. 374–377.
14. Chalupa V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation / V. Chalupa // Biol. Plant. – 1988. – No. 30. – P. 414–421.
15. Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture / V. Chalupa // Ann. Sci. For. – 1993. – No. 50, Suppl. – P. 295–307.
16. Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* L.), beech (*Fagus sylvatica* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) by means of cuttings and explant culture / V. Chalupa // Lesnictvi (Forestry). – 1990. – No. 36. – P. 589–598.
17. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation / A.M. Vieitez [et al.] // Plant Cell Tissue Organ. Cult. – 1994. – No. 37. – P. 287–295.
18. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra* / A.M. Vieitez [et al.] // Plant Cell Tissue Organ. Cult. – 2009. – No. 98. – P. 135–145.
19. Lloyd G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture / G. Lloyd, D. McCown // Plant Propagators Soc. Comb. Proc. – 1980. – P. 421–427.
20. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F.A. Scoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – № 3. – P. 473–497.
21. Oldfield S. The Red List of Oaks / S. Oldfield, A. Eastwood. – Cambridge: Fauna & Flora International, 2007. – 35 p.
22. Sánchez M.C. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees / M.C. Sánchez [et al.] // Tree Physiol. – 1996. – No. 16. – P. 673–680.
23. Savill P.S. Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies / P.S. Savill, P.J. Kanowski // Ann. Sci. For. – Vol. 50, Suppl. 1. – 1993. – P. 368–383.
24. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.) / V. Chalupa [et al.] // Somatic embryogenesis in woody plants. – 1995. – No. 2. – P. 67–87.
25. Vieitez A.M. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement / A.M. Vieitez [et al.] // Eur. J. Forest Res. – 2012. – No. 131. – P. 519–539.

REFERENCES

1. Alekseeva L.A. Rol genotipa pri razmnazhenii duba chereshchatogo i sosny obyknovЕННОi metodom kultury tkanei. *Geneticheskie i ekologicheskie osnovy povysheniia produktivnosti lesov*, Voronezh, 1993, pp. 65–73. (In Russian)
2. Barkalova O.K., Bisikalova T.P. Rezultaty eksperimentov po mikroklonalnomu razmnazheniiu duba mongolskogo (*Quercus mongolica* Fich. ex Ledeb.). *Agrarnyi vestnik Primoria*, 2016, no. 4 (4), pp. 41–44. (In Russian)
3. Butova G.P., Skrobova L.L. Morfogenez i regeneratsiia rastenii duba chereshchatogo v kulture *in vitro*. *Fiziologiya rastenii*, 1988, vol. 35, no. 5, pp. 1023–1030. (In Russian)
4. Kontsevaia I.I. Opredelenie uslovii vvedeniia duba chereshchatogo v kulturu *in vitro*. *Genetika i biotekhnologiya XXI veka. Fundamentalnye i prikladnye aspekty. Proceedings of the International Conference*, Minsk, 3–6 dekabrya 2008 g., Minsk, 2008, pp. 103–105. (In Russian)
5. Kulagin D.V. Biotekhnologicheskie aspekty ratsionalnogo ispolzovaniia geneticheskikh resursov duba chereshchatogo. *Sokhranenie lesnykh geneticheskikh resursov Sibiri. Proceedings of the 3rd International meeting*, Krasnoyarsk, 23–29 avgusta 2011 g., Krasnoyarsk, 2011, pp. 84–85. (In Russian)
6. Mironov D.S. Ekologiya lozhnogo dubovogo trutovika (*Phellinus robustus* Bourd et Yalz) v svyazi s problemoi degradatsii dubrav Tsentralnogo Chernozemia. *Extended abstract of Doctor's biol. thesis*. Voronezh, 2008, 23 p. (In Russian)
7. Mikhno V.B. Landshaftnyi aspekt proizrastaniia, differentsiatsii i strukturnoi organizatsii dubra v srednerusskoi lesostepi. *Vestnik VGU*, 2014, no. 1, pp. 9–17. (In Russian)
8. Semenova V.A., Karpechenko N.A., Karpechenko K.A. Razrabotka metodiki mikroklonalnogo razmnazheniia vzroslykh plusovykh derevev duba chereshchatogo (*Quercus robur* L.) s primeneniem metodov biotekhnologii i molekuliarno-geneticheskogo analiza. *Molodye uchenye – lesnomu khoziaistvu strany. Proceedings of the Scientific and Practical Conference Title*, Pushkino, 2012, pp. 47–52. (In Russian)
9. Filimonova L.V. Razmnazhenie duba chereshchatogo piramidalnoi formy dlia zashchitnogo lesorazvedeniia v Nizhnem Povolzhe. *Extended abstract of Doctor's agr. Thesis*. Volgograd, 1999, 23 p. (In Russian)
10. Kharchenko N.A., Kharchenko N.N. K voprosu o degradatsii poroslevy kh dubrav Tsentralnogo Chernozemia. *Lesnoi vestnik*, 2007, no. 4, pp. 29–31. (In Russian)
11. Tsvetkov I., Atanasov A. Viezmozhnostiza *in vitro* regeneratsiia na rasteniia ot zarodishiii uvenilni fidankina leten dieb (*Quercus robur* L.) *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1992, vol. 6, no. 3, pp. 13–18.
12. Bilous S.Yu. Biotechnological aspects of reproduction of centuries-old oak Maksim Zaliznak in the *in vitro* culture. *Lisove i sadovo-parkove gospodarstvo*, 2012, no. 2, pp. 25–34.
13. Chalupa V. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biol. Plant.*, 1984, no. 26, pp. 374–377.
14. Chalupa V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol. Plant*, 1988, no. 30, pp. 414–421.
15. Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann. Sci. For.*, 1993, no. 50, pp. 295–307.
16. Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* L.), beech (*Fagus sylvatica* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) by means of cuttings and explant culture. *Lesnictvi (Forestry)*, 1990, no. 36, pp. 589–598.
17. Vieitez A.M., Sanchez M.C., Amo-Marco Juan B., Ballester A. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 1994, no. 37, pp. 287–295.

18. Vieitez A.M., Corredoira E., Ballester A., Muñoz F., Durán J., Ibarra M. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 2009, no. 98, pp. 135–145.
19. Lloyd G., McCown D. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture. *Plant Propagators Soc. Comb. Proc.*, 1980, pp. 421–427.
20. Murashige T.A., Scoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497.
21. Oldfield S., Eastwood A. *The Red List of Oaks*. Cambridge, 2007, 35 p.
22. Sánchez M.C., San-Jose M.C., Ballester A., Vieitez A.M. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*, 1996, no. 16, pp. 673–680.
23. Savill P.S., Kanowski P.J. Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies. *Ann. Sci. For.*, vol. 50, suppl. 1, 1993, pp. 368–383.
24. Chalupa V, Jain S, Gupta P, Newton R. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). *Somatic embryogenesis in woody plants*, Springer, Dordrecht, 1995, vol. 2, pp. 67–87.
25. Vieitez A.M., Corredoira E., Martinez M.T., San-Jose M.C., Sanchez C., Valladares S., Vidal N., Ballester A. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur. J. Forest Res.*, 2012, no. 131, pp. 519–539.

Статья поступила в редакцию 13.06.2018