

Глава 4.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 630\*232+631.532

doi: 10.31360/2225-3068-2022-80-85-90

**ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ  
ПЕРВИЧНЫХ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO*  
ОТ 40-ЛЕТНИХ ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО**

**Гусева О.Ю.**

*Всероссийский научно-исследовательский  
институт лесной генетики, селекции и биотехнологии,  
г. Воронеж, Россия, e-mail: guseva.oks2017@yandex.ru*

Применение метода клонального микроразмножения с целью сохранения хозяйственно-ценных экземпляров дуба черешчатого может быть ограничено из-за сильной инфицированности растительного материала взрослых деревьев. Исследование связано с изучением влияния режима стерилизации и генотипа на получение жизнеспособных культур дуба черешчатого. Для работы отбирались зелёные побеги от 40-летних деревьев дуба в период активной вегетации. Обработка мертиолятом позволяла получить высокий процент асептических культур в 2020 г., в то время как раствор белизны оказался неподходящим для стерилизации летних побегов дуба. На успешность асептики также влиял фактор генотипической изменчивости исходных деревьев, который частично удавалось нивелировать за счёт использования более жёсткого стерилизующего агента. В целом эффективность асептики в 2020 г. была выше по сравнению с результатами следующего года. Данное явление может быть связано с аномально жаркой погодой в Воронежской области в период сбора образцов для исследования летом 2021 г.

**Ключевые слова:** *Quercus robur* L., асептика, *in vitro*, узловыe сегменты, экспланты.

Одной из основных проблем клонального микроразмножения взрослых деревьев дуба черешчатого является получение стерильных жизнеспособных первичных культур [7–9]. В первую очередь это связано с накоплением в процессе онтогенеза растения внутренней и внешней инфекции [1, 8]. Таким образом, необходим поиск мер, повышающих эффективность асептики образцов с целью сохранения качественного селекционного материала. В различных исследованиях по клонированию *in vitro* дуба черешчатого применялись следующие дезинфицирующие средства: перекись водорода и нитрат серебра 1%-ный [2], хлорид ртути [3, 4, 10], гипохлорит натрия [6], 0,1%-ный раствор сулемы [5], диацид 0,1%-ный [1].

**Цель исследования** – получение асептических жизнеспособных культур *in vitro* от взрослого материала дуба черешчатого. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

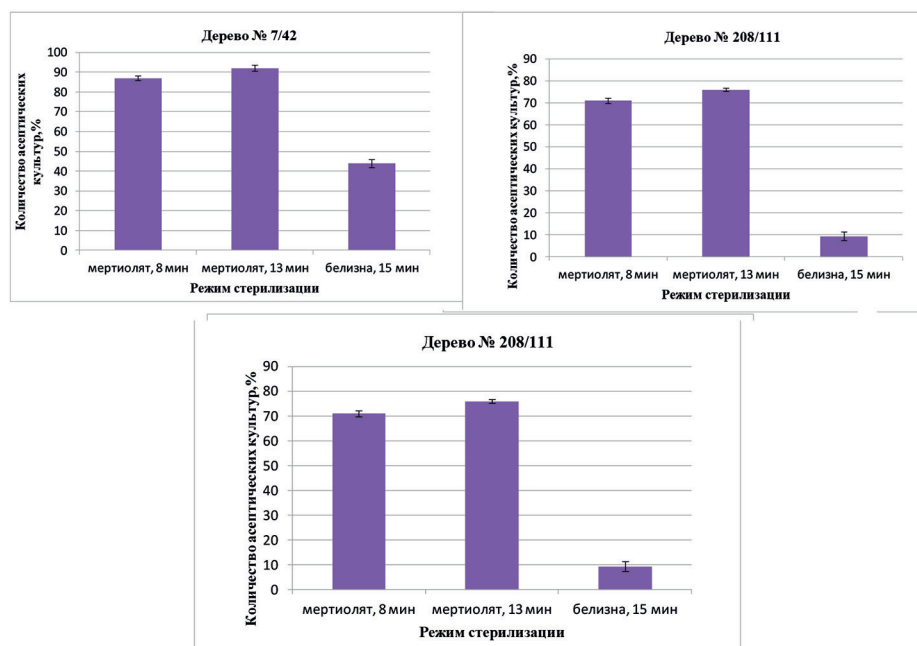
1) определить оптимальные режимы стерилизации эксплантов дуба черешчатого;

2) изучить влияние генотипической изменчивости исходных для клонального микроразмножения деревьев на эффективность асептики первичных культур.

**Объекты и методы исследований.** Для экспериментов по клональному микроразмножению дуба отбирали зелёные побеги текущего вегетационного периода от 8 деревьев 40-летнего возраста, произрастающих на территории Семилукского лесопитомника Воронежской области. Экспланты помещали на 7 минут в 0,02%-ный раствор «Domestos», после чего тщательно промывали в проточной воде в течение 10 минут. Дальнейшую обработку растительного материала проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. В качестве стерилизующих средств использовали: 0,02%-ный р-р мертиолята (8 или 13 мин) или р-р белизны (белизна: вода – 1 : 1,15 мин). Затем растения промывали 4 раза по 5 минут стерильной дистиллированной водой. Расчерекованные в чашках Петри узловые сегменты размером 1,5–2 см с 1–2 почками помещали по одному в биологические пробирки с питательной средой ВТМ, дополненной 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП).

Исследования проводили в июне-июле 2020 и 2021 гг. Культивирование *in vitro* первичных эксплантов осуществляли в стандартных условиях ( $25 \pm 2$  °С, фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь, освещённость 2,0 клк) с интервалом субкультивирования 1 раз в 2 недели. Все опыты проводились в трёх повторностях (не менее 20 культур на 1 опыт). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Stadia.

**Результаты и их обсуждение.** В экспериментах 2020 г. количество асептических культур варьировало в зависимости от генотипа исходного дерева. Использование раствора мертиолята (8 минут) показало свою эффективность для образцов № 7/42 и № 208/111 (87,0 % и 71,0 %, соответственно), а для эксплантов от дерева № 242/36 таким способом было получено всего 58,0 % стерильных культур. Результаты исследования так же показали, что применение раствора белизны оказалось малоэффективным (получено не более 55,0 % асептических культур). Более жёсткая обработка растительного материала с использованием ртутьсодержащего соединения (мертиолята) в течение 13 минут позволяла значительно повысить количество асептических жизнеспособных эксплантов с 44,0 до 92,0 % для дерева № 7/42, с 9,0 до 77,0 % для № 208/111 и с 55,0 до 71,0 % – для № 242/36 (рис. 1 и 2).



**Рис. 1.** Эффективность стерилизации эксплантов, полученных от 40-летних деревьев дуба черешчатого, 2020 г.



**Рис. 2.** Асептические жизнеспособные экспланты от 40-летних побегов дуба черешчатого (дерево № 7/42) через неделю (слева) и месяц (справа) после введения в культуру *in vitro*

Больше всего чистых культур в 2021 г. было получено от дерева № 7/42 (59,0 %). Количество асептических эксплантов под номерами 5/26 и 8/54 было несколько ниже (37,0 и 25,0 % чистых культур). Деревья № 57/69,

№ 189/36, № 6/36 оказались сильно поражены инфекцией (всего 9,6–12,0 % асептических эксплантов). Самая высокая скорость роста пазушных побегов на первичных эксплантах через 3 недели культивирования наблюдалась у образцов, полученных от дерева № 7/42 (39,0 % от общего числа исходных эксплантов данного генотипа), в то время как узловые сегменты под номерами 5/26 и 8/54 обладали более низким регенерационным потенциалом. Оставшиеся асептические культуры образовывали побеги на стадии конуса нарастания или с высотой  $\geq 15$  мм (табл. 1).

Таблица 1

**Стерилизация и морфогенез  
первичных эксплантов дуба через 3 недели культивирования  
*in vitro* в зависимости от генотипа исходного дерева, 2021 г.**

№ дерева	Количество асептических жизнеспособных культур, % *	Общее количество морфогенных культур, % **	
		побеги на стадии конуса нарастания	побеги с $h \geq 15$ мм
7/42	59,0 $\pm$ 0,5	20,0 $\pm$ 0,7	39,0 $\pm$ 0,7
5/26	37,0 $\pm$ 2,3	37,0 $\pm$ 2,3	–
8/54	25,0 $\pm$ 1,4	9,3 $\pm$ 1,6	–
57/69	12,0 $\pm$ 2,1	8,0 $\pm$ 7,4	4,0 $\pm$ 7,4
189/36	9,6 $\pm$ 1,7	3,2 $\pm$ 7,4	6,4 $\pm$ 7,4
6/36	12,0 $\pm$ 1,6	9,0 $\pm$ 1,7	3,0 $\pm$ 0,9

Примечание: \*Режим стерилизации – раствор мертиолята (13 минут);

\*\*Состав питательной среды – ВТМ + 0,2 мг/л БАП

**Заключение.** Эффективность асептики культур дуба зависела как от выбора стерилизующего агента, так и генотипических особенностей исходных для клонирования деревьев. Наиболее подходящим режимом для стерилизации эксплантов дуба черешчатого оказался раствор мертиолята в течение 13 минут (до 92,0 % асептических культур). Обработка белизной была неэффективна для побегов взрослых деревьев дуба. При данном режиме стерилизации удавалось получить не более 9,4–55,0 % чистых культур (в зависимости от генотипа). В целом следует отметить, что при одинаковой обработке материала, общее количество полученных в 2021 г. асептических культур было значительно ниже по сравнению с результатами стерилизации предыдущего года. Данное явление можно объяснить следствием аномально жаркой погоды в 2021 г. в период активной вегетации дуба, что могло повлиять на рост инфекции в испытываемых образцах.

**Библиографический список**

1. Концевая И.И. Определение условий введения Дуба черешчатого в культуру *in vitro* // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы междунар. науч. конф., Минск, 3-6 декабря, 2008 г. – Минск, Изд. центр БГУ, 2008. – С. 103-105. – ISBN 978-985-476-625-2.
2. Bilous S.Yu. Biotechnological aspects of reproduction of centuries-old oak Maksim Zaliznak in the *in vitro* culture // Лісове і садово-паркове господарство. – 2012. – № 2. – P. 25-34.
3. Branka P., Sibila J. *In vitro* growth and development of oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) // Acta Bot. Croat. – 1986. – № 45. – P. 55-61.
4. Chalupa V. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) // Biologia Plantarum. – 1984. – № 26. – P. 374-377.
5. Chalupa V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture // Ann. Sci. For. – 1993. – № 50. – P. 295-307.
6. Crecente Campo S., Fernandez J.L. Lorenzo in jerto en serie ‘acelerado’ de *Quercus robur* adulto // Cuad. Soc. Esp. Cienc. For. – 2008. – № 24. – P. 45-50. – ISSN 1575-2410.
7. Vieitez A.M. Sanchez C., Amo-Marco J.B., Ballester A. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1994. – № 37. – P. 287-295. – <https://doi.org/10.1007/BF00042342>.
8. Mac An tSaoir S., J. O'Brien. *Ex vitro* growth studies of *Quercus robur* // Irish Forestry. – 1999. – Vol. 56. – № 2. – P. 18-21.
9. 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 Physiol. – 1996. – № 16. – P. 673-680. – <https://doi.org/10.1093/treephys/16.8.673>.
10. Timofte1 A.I., Pamfil D., Palada-Nicolau M., Timofte C. S. The effect of different factors upon the *in vitro* propagation in *Quercus robur* and *Q. frainetto* by somatic embryogenesis // Not Bot Hort Agrobot Cluj. – 2011. – Vol. 39(1). – P. 288-291. – <http://dx.doi.org/10.15835/nbha3915481>.

**CHARACTERISTIC  
OF OBTAINING PRIMARY MORPHOGENIC  
CULTURES *IN VITRO* FROM 40-YEAR-OLD OAK TREES**

**Guseva O.Yu.**

*Russian Research Institute  
of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology,  
Voronezh, Russia, e-mail: guseva.oks2017@yandex.ru*

The method of clonal micropropagation used in order to preserve economically valuable specimens of common oak may be limited due to the strong infection of plant material from adult trees. This paper studied the effect of sterilization regime and genotype on the production of viable oak cultures. Green shoots from 40-year-old oak trees were selected for the work during an active growing season. Treatment with merthiolate allowed us to obtain a high percentage of aseptic crops in 2020, while the bleach solution turned out to be unsuitable for sterilization of summer oak shoots. The success of asepsis was also influenced by the coefficient of genotypic variation in initial trees, which was partially balanced by using a more rigid sterilizing agent. In general, the effectiveness of asepsis in 2020 was higher