



**М. М. Лісовий**

Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна

## ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *THUJA OCCIDENTALIS* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

Наведено огляд та аналіз літературних джерел, які стосуються мікроклонального розмноження *Thuja occidentalis* L. в умовах *in vitro*. Коротко охарактеризовано господарську цінність досліджуваного виду та, на основі цього, обґрунтовано доцільність проведення запланованих досліджень. Подано список найпоширеніших у садово-парковому господарстві декоративних форм *Thuja occidentalis* L. Детально охарактеризовано застосовану методику проведення експериментальних досліджень з отримання асептичної культури *Thuja occidentalis* L. під час розмноження *in vitro*: хімічні реактиви, якими виконували деконтамінацію вихідних експлантів, їх концентрації та комбінації. Протестовано низку схем виконання деконтамінації експлантів досліджуваного виду із застосуванням одного хімічного агента та різних їх комбінацій. Визначено оптимальну схему проведення ступінчастої стерилізації вихідних експлантів *Thuja occidentalis* L. для розмноження *in vitro*, яка забезпечила вихід 87,67<sup>±1,00</sup>% життєздатного рослинного матеріалу і полягає у почерговому його обробітку такими хімічними агентами: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (96 %; 5 с) + H<sub>2</sub>O з детергентом (6 год) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %; 10 хв) + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (70 %; 5 с) + AgNO<sub>3</sub> (0,2 %; 10 хв) + HgCl<sub>2</sub> (1 %; 10 хв). Узагальнено та проаналізовано отримані результати.

**Ключові слова:** *Thuja occidentalis* L.; *in vitro*; експлант; деконтамінація; живильне середовище.

**Вступ.** Туя західна (*Thuja occidentalis* L.) – вічнозелене дерево або чагарник, який в умовах природного ареалу може сягати висоти до 30 м (Bilous, 2003; Brodovych & Brodovych, 1979; Kriussman, 1986; Lisoviy, 2015; Lisoviy, & Huz, 2015). Для досліджуваного виду характерні вузько конічна крона та галушення гілок у горизонтальній площині. Кора завтовшки 0,5-1,0 см, від червонуватого до сіро-коричневого кольору, дрібнотріщинувата, волокниста, злущується тонкими пасмами (Kriussman, 1986). Треба зазначити, що туя західну широко культивують по всій Європі та в Україні ще із кінця XVIII ст.

Досліджуваному виду притаманний значний генетичний поліморфізм, що дає змогу широко використовувати його в садово-паркових композиціях як регулярного, так і пейзажного планування. Найпоширенішими в озелененні населених пунктів є такі декоративні відміни туї західної: 'Columna'; 'Malonyana'; 'Holmstrup'; 'Brabant'; 'Rosenthalii'; 'Fastigiata' ('Stricta'); 'Douglassii pyramidalis'; 'Viridis'; 'Ellwangeriana'; 'Theodonsensis'; 'Wareana'; 'Asplenifolia'; 'Filiformis'; 'Recurvata'; 'Ellwangeriana'; 'Robusta'; 'Pendula'; 'Ohlendorffii'; 'Wagneriana'; 'Globosa'; 'Globosa nana'; 'Cristata'; 'Plicata'; 'Hilside'; 'Woodwardii'; 'Brobeck's Tower'; 'Recurvata nana'; 'Ericoides'; 'Compacta'; 'Stolwijk'; 'Globosa Compacta'; 'Fillicoides'; 'Umbraculifera'; 'Plicata pigmaea'; 'Lutea'; 'Aurea'; 'Aureospicata'; 'Aurea-variegata'; 'Semperaurea'; 'Lutescens'; 'Yellow Ribbon'; 'Alba'; 'Variegata'; 'Albospica'; 'Riversii'; 'Amber Glow'; 'Vervaeneana'; 'Recurvata argenteo-variegata'; 'Smaragd Light'; 'Rheingold'; 'Ellwangeriana aurea'; 'Columbia'; 'Pendula glauca'; 'Aureo spicata'; 'Aures-

cens'; 'Europe Gold'; 'Frieslandia'; 'Hoveyi'; 'Lutea nana'; 'Filips Magic Moment'; 'Golden Globe'; 'Hoseri'; 'Golden Tuffet'; 'Barabits'; 'Cerviconis'; 'Cherry Valley'; 'Conica'; 'Compacta'; 'Corley'; 'Darling Susie'; 'Fastigiata'; 'Globosa'; 'Himmel Broom'; 'Julian's Weeper'; 'Kellermanii'; 'Královstvi'; 'Karsten'; 'Kornik'; 'Krejci'; 'Lakatos Gömb'; 'Lanarck'; 'Liliput'; 'Multicaulis'; 'Paper Lanterns'; 'Pendula'; 'Pendulina'; 'Pit van Geet'; 'Puli'; 'Pyramidalis'; 'Repens'; 'Spacek'; 'Virgata'; 'Brebuda'; 'Glauca'; 'Laxa'; 'Little Bogle'; 'Lombarts'; 'Nukmitz'; 'Paula'; 'Pesek'; 'Autumn Gold Weeping' тощо (Brodovych & Brodovych, 1979; Kokhno et al., 2001; Zaiachuk, 2008; Kalinichenko, 2003; Kolesnikov, 1974; Kriussman, 1986; Lisoviy, 2015; Lisoviy & Huz, 2015; Lisoviy & Mykhatska, 2012).

Із врахуванням господарської цінності досліджуваного виду можна зробити висновок про доцільність удосконалення сучасних методик його розмноження, зокрема мікроклонування, першочерговим завданням якого є отримання асептичної культури (Butenko, 1999; Butenko, 1986).

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Кабір М. Н. та ін. як експланти застосовували апікальні пагони завдовжки близько 2 см, які стерилізували протічною водою з мийним засобом (15 хв), 40%-м препаратом "Слогах" (5 хв), 0,1%-м розчином хлориду ртуті (5 хв), після чого промивали стерильною дистильованою водою. Культивування проводили на живильному середовищі MS, яке модифікували фітогормонами BA та Kn із додаванням NAA. Для укорінення застосовували 1/2 MS із додаванням IBA, IAA та NAA. На вільному від

### Інформація про авторів:

**Лісовий Микола Миколайович**, канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри лісових культур і лісової селекції, докторант.

Email: lisovij82@gmail.com

**Цитування за ДСТУ:** Лісовий М. М. Особливості отримання асептичної культури *Thuja Occidentalis* L. в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. 2017. Вип. 27(9). С. 27–29.

**Citation APA:** Lisoviy, M. M. (2017). Some Features of Obtaining Aseptic Culture of *Thuja Occidentalis* L. Under in vitro Conditions. *Scientific Bulletin of UNFU*, 27(9), 27–29. <https://doi.org/10.15421/40270905>

гормонів середовищі спостерігали такі результати: середня кількість пагонів на експлант  $6,57^{±0,45}$  шт.; середня довжина пагонів  $4,5^{±0,27}$  см. Найкраще укорінення отримали на середовищі 1/2 MS + 1,0 мг/л ІВА: середня кількість коренів  $3,92^{±0,28}$  шт.; середня довжина  $3,64^{±0,38}$  см (Kabir, Roy & Ahmed, 2006). Nour K. A. та Thorpe T. A. отримали 10-14 пазушних пагонів під час культивування експлантів на середовищі 1/2 Quoirin and LePoivre із додаванням 10 мМ стерилізованого зеатину (Nour & Thorpe, 1993). Indra S. Haryu та ін. досліджували соматичний ембріогенез туї західної. Індукцію зародків отримано під час культивування експлантів (20-25 діб) на живильному середовищі Quoirin and Le Poivre із додаванням ВА та 2-ізопентиладеніну. Автори зазначають, що цим способом можна отримати більше 250 рослин з одного ембріона (Haryu et al., 1987). Загалом дослідження перспективи розмноження методом *in vitro* туї західної виконано у досить обмеженій кількості наукових праць, що і зумовлює актуальність проведених досліджень.

**Матеріали та методи дослідження.** Експериментальні дослідження з отримання асептичної культури туї західної проведено у лабораторії культури тканин кафедри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України за загальноприйнятими біотехнологічними методиками (Musiienko & Paniuta, 2005). Як експланти застосовували невеликі частинки верхівок пагонів (4-6 мм завдовжки), заготовлені із відносно молодих рослин (віком 4-7 років).

Для деконтамінації вихідних експлантів застосовували ступінчасту схему стерилізації, яка полягала у по черговому обробітку рослинного матеріалу такими стерилізаційними агентами різної концентрації та у різних комбінаціях: протічна вода ( $H_2O$ ) з детергентом ("Твін 80"); пероксид водню ( $H_2O_2$ ); медичний етиловий спирт ( $C_2H_5OH$ ); гіпохлорид натрію ( $NaClO$ ); нітрат срібла ( $AgNO_3$ ) та сулема ( $HgCl_2$ ). Після кожного реактиву експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою у всіх варіантах дослідів по 4-5 хв (Bilous, 2003; Brodovych & Brodovych, 1979; Butenko, 1986; 1999; Kataeva & Butenko, 1983; Kushnir & Sarnatska, 2005) (табл. 1). Для подолання внутрішніх інфекцій вихідні експланти перед пасажом обробляли 0,1 %-м водним розчином антибіотика "Іманін" (Imaninum). Усі роботи виконували у максимально стерильних умовах.

**Табл. 1. Застосовані стерилізанти для деконтамінації експлантів**

№ з/п	Стерилізаційний агент	Концентрація	Експозиція
1	протічна $H_2O$ + детергент + "Твін 80"	10 + 5 г/л	2, 4, 6 год
2	$H_2O_2$	1; 2; 3 %	3; 5; 10 хв
3	$C_2H_5OH$ *	50; 70; 96 %	5; 10; 15 с
4	$NaClO$	10; 20; 30 %	3; 5; 7 хв
5	$AgNO_3$	0,1; 0,2; 0,3 %	5; 10; 15 хв
6	$HgCl_2$	1; 2; 3 %	5; 10; 15 хв

Примітка: \* усі варіанти дослідів також проведено із першочерговим обробітком експлантів етанолом, для видалення смоляного нальоту.

Простерилізовані експланти, за наведеними у табл. 1 схемами, пасажували на живильне середовище за рецептом MS (Murashige and Skoog) без фітогормонів та проводили спостереження впродовж 10-15 діб. Після цього, експланти класифікували на дві групи: асептичні (стерильні) та заражені патогенами (інфіковані, контаміновані). На основі отриманих результатів визначали такі показники стерилізації: ефективність стерилізації

( $EC$ ) ( $EC = nC/N \times 100$  %, де:  $nC$  – кількість отриманих асептичних експлантів, шт.;  $N$  – загальна кількість простерилізованих експлантів, шт. та життєздатність експлантів ( $ЖЕ$ ), ( $ЖЕ = nЖ/N \times 100$  %, де  $nЖ$  – кількість отриманих живих експлантів (без некротичних та інфікованих), шт.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дослідження з деконтамінації вихідних експлантів туї західної виконували у два етапи: "первинна стерилізація" та "модифікована стерилізація". Перший полягав в обробітку рослинного матеріалу протічною водою з детергентом, пероксидом водню та етиловим спиртом у наведених вище концентраціях та комбінаціях. Найбільшу кількість асептичного рослинного матеріалу (52,9 %) отримано за такої схеми стерилізації:  $C_2H_5OH$  (96 %; 5 с) +  $H_2O$  з детергентом (6 год) +  $H_2O_2$  (3 %; 10 хв) +  $C_2H_5OH$  (70 %; 5 с). У всіх інших варіантах дослідів цей показник був нижчим за 50 %.

Оскільки, на нашу думку, "первинна стерилізація" не забезпечила задовільних результатів, додатково було застосовано "модифіковану стерилізацію", яку виконували такими хімічними агентами: гіпохлорид натрію, нітрат срібла та сулема. Кожен із наведених агентів спочатку використовували окремо. Найвищі результати отримано за концентрацій та експозицій, наведених у табл. 2.

**Табл. 2. Результати застосування стерилізанти-модифікаторів**

№ з/п	Характеристика застосованого стерилізанта	EC, %	ЖЕ, %
1	$AgNO_3$ (0,2 %; 10 хв)	80,0	76,7
2	$NaClO$ (20 %; 5 хв)	73,3	73,3
3	$HgCl_2$ (1 %; 10 хв)	83,3	83,3

Дані табл. 2 свідчать, що найвищу ефективність стерилізації та життєздатність експлантів (по 83,3 %) забезпечила модифікація "первинної стерилізації" реагентом  $HgCl_2$  концентрацією 1 % та експозицією 10 хв. Незначно нижчі результати зафіксовано в разі використання як модифікатори  $AgNO_3$  та  $NaClO$ , у наведених характеристиках: 80,0 % ( $EC$ ) і 76,7 % ( $ЖЕ$ ) та по 73,3 % кожного показника відповідно.

Для підвищення отриманих результатів протестовано схему деконтамінації, яка включала в себе обов'язкове застосування "первинної стерилізації" та комбінацій усіх трьох стерилізанти-модифікаторів, а також по чергове їх виключення. Найвищі досліджувані показники ( $EC$  –  $89,33^{±0,83}$  %  $ЖЕ$  –  $87,67^{±1,00}$  %) отримано за стерилізації експлантів туї західної по черговим їх обробітком такими стерилізантами:  $C_2H_5OH$  (96 %; 5 с) +  $H_2O$  з детергентом (6 год) +  $H_2O_2$  (3 %; 10 хв) +  $C_2H_5OH$  (70 %; 5 с) +  $AgNO_3$  (0,2 %; 10 хв) +  $HgCl_2$  (1 %; 10 хв).

**Висновки.** За результатами проведених досліджень можна зробити висновок про значний вплив концентрації, тривалості обробітку, комбінації та типу застосованих хімічних агентів на результати стерилізації вихідного рослинного матеріалу *Thuja occidentalis* L. під час розмноження *in vitro*. Найдоцільнішою виявилась така ступінчаста схема деконтамінації експлантів досліджуваного виду. Найбільшу кількість асептичних експлантів забезпечила така схема деконтамінації:  $C_2H_5OH$  (96 %; 5 с) +  $H_2O$  з детергентом (6 год) +  $H_2O_2$  (3 %; 10 хв) +  $C_2H_5OH$  (70 %; 5 сек) +  $AgNO_3$  (0,2 %; 10 хв) +  $HgCl_2$  (1 %; 10 хв), застосування якої забезпечило вихід  $87,67^{±1,00}$  % життєздатного рослинного матеріалу.

## Перелік використаних джерел

- Bilous, V. I. (2003). *Lisova selektsiia*. Uman: Umanske vydavnycho-polihrafichne pidpriemstvo. 534 p. [in Ukrainian].
- Brodovych, T. M., & Brodovych, M. M. (1979). *Dereva i chaharnyky zakhodu URSR. Atlas*. Lviv: Vyshcha shkola. 251 p. [in Ukrainian].
- Butenko, R. G. (1986). *Kultura kletok rastenii i biotekhnologii*. Moscow: Nauka. 285 p. [in Russian].
- Butenko, R. G. (1999). *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove*. Moscow: FBK-PRESS. 160 p. [in Russian].
- Harry, I. S., Thompson, M. R., Chin-Yi, Lu., & Thorpe, T. A. (1987). *In vitro* plantlet formation from embryonic explants of eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.). *Tree Physiol*, 3(3), 273–283. <https://doi.org/10.1093/treephys/3.3.273>
- Kabir, M. H., Roy, P. K., & Ahmed, G. (2006). *In vitro* Propagation of *Thuja occidentalis*. *Through Apical Shoot Culture Plant Tissue Cult. & Biotech*, 16(1), 5–9. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v16i1.1099>
- Kalinichenko, O. A. (2003). *Dekoratyvna dendrolohiia*. Kyiv: Vyshcha shkola. 199 p. [in Ukrainian].
- Kataeva, N. V., & Butenko, R. G. (1983). *Klonalnoe mikrorazmnozhennye rastenii*. Moscow: Nauka. 96 p. [in Russian].
- Kokhno, M. A., (Ed.), Hordiienko, V. I., Zakharenko, H. S. et al. (2001). *Dendroflora Ukrainy. Dykorosli ta kultyvovani dereva y kushchi. Holonasinni: dovidnyk*; NAN Ukrainy, Nats. bot. sad im. M. M. Hryshka. Kyiv: Vyshcha shkola. 207 p. [in Ukrainian].
- Kolesnikov, A. I. (1974). *Dekoratyvnaia dendrologiia*. Moscow: Lesnaia promyshlennost. 700 p. [in Russian].
- Kriussman, G. (1986). *Khvoinye porody: per. s nem.* Moscow: Lesnaia promyshlennost. 256 p. [in Russian].
- Kushnir, H. P., & Samatska, V. V. (2005). *Mikroklonalne rozmnozhennia roslin*. Kyiv: Nauk. dumka. 450 p. [in Ukrainian].
- Lisovi, M. M., & Huz, M. M. (2015). Polimorfizm ta osoblyvosti vchetatyvnoho rozmnozhennia zhyvtsiuvanniam dekoratyvnykh form *Thuja occidentalis* L. *Lisivnytstvo i ahrolisomeliorsatsiia*, 126, 132–138. [in Ukrainian].
- Lisovi, M. M., & Mykhatska, L. V. (2012). Polimorfizm tui zakhidnoi. *Zakhyst navkolyshnoho seredovyshcha. Zbalansovane pryrodokorystuvannia: materialy piatoi studentskoi naukovo-praktychnoi konferentsii*. Lviv: DUONS, 69–72. [in Ukrainian].
- Lisovi, N. N. (2015). Avtovegetativnoe rozmnozhennia nekotorykh dekoratyvnykh form *Thuja occidentalis* L. *Plodovodstvo, semenovodstvo, introduktsiia drevesnykh rastenii: materialy XVII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii*. Krasnoarsk: SibGTU. 40–43. [in Russian].
- Musiienko, M. M., & Paniuta, O. O. (2005). *Biotechnologiya roslin*. Kyiv: VPTs "Kyivskiy universytet". 114 p. [in Ukrainian].
- Nour, K. A., & Thorpe, T. A. (1993). *In vitro* shoot multiplication of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 29, 65–71.
- Zaiachuk, V. Ya. (2008). *Dendrolohiia*. Lviv: Apriori. 656 p. [in Ukrainian].

**Н. Н. Лисовий**

Національний лесотехнічний університет України, г. Львів, Україна

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *THUJA OCCIDENTALIS* L. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Приведены обзор и анализ литературных источников, касающихся микроклонального размножения *Thuja occidentalis* L. в условиях *in vitro*. Кратко охарактеризована хозяйственная ценность исследуемого вида и, на основе этого, обоснована целесообразность проведения запланированных исследований. Представлен список наиболее распространенных в садово-парковом хозяйстве декоративных форм *Thuja occidentalis* L. Подробно охарактеризована примененная методика проведения экспериментальных исследований по получению асептической культуры *Thuja occidentalis* L. при размножении *in vitro*: химические реактивы, которыми выполняли деконтаминацию выходных эксплантов, их концентрации и комбинации. Протестирован ряд схем выполнения деконтаминации эксплантов изучаемого вида с применением одного химического агента и различных их комбинаций. Определена оптимальная схема проведения ступенчатой стерилизации исходных эксплантов *Thuja occidentalis* L. для размножения *in vitro*, которая обеспечила выход 87,67<sup>±1,00</sup>% жизнеспособного растительного материала и заключается в последовательной его обработке следующими химическими агентами: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (96 %, 5 с) + H<sub>2</sub>O с моющим средством (6 ч) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %, 10 мин.) + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (70 %, 5 с) + AgNO<sub>3</sub> (0,2 %, 10 мин) + HgCl<sub>2</sub> (1 %, 10 мин). Обобщены и проанализированы полученные результаты.

**Ключевые слова:** *Thuja occidentalis* L.; *in vitro*; эксплант; деконтаминация; питательная среда.

**М. М. Lisovi**

Ukrainian National Forestry University, Lviv, Ukraine

## SOME FEATURES OF OBTAINING ASEPTIC CULTURE OF *THUJA OCCIDENTALIS* L. UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

*Thuja occidentalis* L. has been widely cultivated in Europe and Ukraine since the end of 18th century. The considerable economic value of the investigated species predetermines expediency of improvement of modern reproduction methodologies, in particular in the *in vitro* conditions. Experimental researches on obtaining of sterile culture of western Thuja were conducted in laboratory of tissue culture at the Forestry and Forest Selection Department of UNFU according to generally accepted methods in biotechnology. Decontamination of explants was executed by till of vegetable material by the next sterilizing agents of different concentration and in different combinations: H<sub>2</sub>O with "Twin 80"(2, 4, 6 hours); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 2, 3 %; 3, 5, 10 minutes); C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (50, 70, 96 %; 5, 10, 15 seconds); NaClO (10, 20, 30 %; 3, 5, 7 minutes); AgNO<sub>3</sub> (0.1, 0.2, 0.3 %; 5, 10, 15 minutes); HgCl<sub>2</sub> (1, 2, 3 %; 5, 10, 15 minutes). For elimination of internal infections of explants before seating processed 0.1 % water solution to the antibiotic of Imaninum, sterile explants were placed on the nourishing environment of MS (Murashige and Skoog). On the basis of the results obtained we determined the efficiency of sterilization and viability of explants. Decontamination of explants was executed in two stages: "primary sterilization" and "modified sterilization". We got most of aseptically viable material (52.9 %) on the first stage at the next chart of sterilization: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (96 %, 5 seconds) + H<sub>2</sub>O (6 hours) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %, 10 minutes) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (70 %, 5 seconds). In order to increase the results obtained there was the tested chart of decontamination, that included for itself obligatory application of "primary sterilization" and combinations all three chemical agents (NaClO, AgNO<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>), and there by turn exception. The greatest investigated indexes (efficiency of sterilization – 89.33<sup>±0.83</sup>% and viability of explants – 87.67<sup>±1.00</sup>%) were obtained during sterilization of explants of western Thuja according to the following scheme: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (96 %, 5 seconds) + H<sub>2</sub>O (6 hours) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %, 10 minutes) + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (70 %, 5 seconds) + AgNO<sub>3</sub> (0.2 %, 10 minutes) + HgCl<sub>2</sub> (1 %, 10 minutes). As a result of undertaken studies it is possible to draw conclusion about considerable influence, concentrations, duration of till, combination and type of the applied chemical agents on the results of sterilization of vegetable feedstock of *Thuja occidentalis* L. at reproduction *in vitro*.

**Keywords:** *Thuja occidentalis* L.; *in vitro*; explants; decontamination; the culture medium.