

<sup>1</sup> Зкирен Г.К., <sup>2</sup> Сирман Д.Ю., <sup>2</sup> Додонова А.Ш.

<sup>1</sup> Филиал северного региона РГКП "Республиканский лесной селекционный центр",  
Щучинск, Казахстан

<sup>2</sup> Карагандинский государственный университет им. академика Е.А.Букетова,  
Караганда, Казахстан  
(E-mail: <sup>1</sup> Galina\_world@list.ru, <sup>2</sup> Den-diatoma@mail.ru, <sup>2</sup> Sasha\_dodonova1@mail.ru)

### Получение асептических проростков и эксплантов туи западной (*Thuja occidentalis* L.) в условиях *in vitro*.

**Аннотация:** В статье представлены результаты испытаний метода получения асептических проростков ландшафтной культуры *Thuja occidentalis* L. в условиях *in vitro*. Был рассмотрен широкий спектр стерилизующих агентов и отработана методика стерилизации семян, с учетом агрессивности стерилизующих агентов и биологии прорастания семян. Приведены результаты влияния концентрации гормонов на рост и развитие проростков туи в различных питательных средах. Растения регенеранты после полного развития сеянцев были перемещены в закрытый грунт для дальнейших наблюдений.

**Ключевые слова:** эксплант, ландшафтная культура, регуляторы роста, питательная среда, *in vitro*.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2018-124-3-97-103>

**Введение.** Туя западная (*Thuja occidentalis*) - вечнозелёное хвойное дерево из семейства Кипарисовых (Cupressaceae). Благодаря большому количеству высокодекоративных искусственно выведенных форм, зимостойкости, долговечности и устойчивости к городским условиям, туя западная очень широко распространена в декоративном садоводстве по всем континентам во многих климатических зона [1].

Массовое получение редких и ценных видов растений, получение их биомассы, как источника важных биологически активных веществ, являются одними из направлений позволяющих расширить применение растительных ресурсов в хозяйственной деятельности человека [2,3]. В лесном хозяйстве разных стран мира все большее значение приобретает плантационное лесовыращивание, поскольку специализированные плантации имеют ряд преимуществ по сравнению с естественными лесами, обеспечивая более низкую себестоимость сырья вследствие близкого расположения сырья к производству. Для создания специализированных плантаций используется селекционно улучшенный посадочный материал (формы древесных пород с повышенной продуктивностью), что позволяет формировать древостой с необходимой сортиментной структурой и сокращенными сроками выращивания [4]. Так, в Швеции и Финляндии интенсивно ведется селекция березы по улучшению качества ствола, а полученные сорта уже несколько десятилетий в производственных масштабах размножаются с применением технологии *in vitro* [5]. В филиале института биоорганической химии РАН им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова методом клонального микроразмножения ведется культивирование триплоидных форм осины и березы [6]. В лаборатории лесовосстановления СПбНИИЛХ разработана технология микро- клонального размножения элитных клонов осины [7].

Известно, что хвойные растения содержат большое количество вторичных соединений, которые широко используются в фармакологии. Одной из таких культур является туя западная, которая применяется в лечении бронхиального катара, энуреза, цистита, псориаза, карцином матки, аменореи и ревматизма [8, 9]. Сегодня она в основном используется в гомеопатии в качестве материнской настойки или разбавления [10, 11]. В сочетании с другими иммуномодулирующими растениями, такими как эхинацея пурпурная, эхинацеи рапша и баптизия красильная, это лекарственное растение также используется в качестве научно-обоснованной фитотерапии при острых и хронических инфекциях верхних дыхательных

путей [12; 13], а также в качестве адьюванта к антибиотикам для лечения тяжелых бактериальных инфекций, таких как бронхит, ангина, фарингит, отит и синусит [14, 15].

Клональное микроразмножение растений можно проводить разными способами, в том числе активируя пазушные меристемы, стимулируя образование побегов непосредственно из ткани экспланта или пролиферацию каллуса с последующей регенерацией из него растений [16]. Так, из одного растения используя различные методы микрклонального размножения можно получать до 1 млн. растений-эксплантов. На первых этапах микрклонального размножения стоит задача введения природного материала в культуру *in vitro*.

Исследования в области культуры ткани имеют свои особенности, связанные с методическими вопросами клонального микроразмножения: подбор питательных сред для каждого таксона растений, подбор температурных и световых условий на всех стадиях клонального микроразмножения, выявление частоты соматклональных вариаций и их влияния на изменчивость образцов [17, 18].

Цель исследования. Оптимизация методики получения асептических проростков туи западной (*Thuja occidentalis*).

**Материалы и методы.** Исследования проводились на базе "Лаборатории микрклонального размножения древесно-кустарниковых пород" Северного отделения РГКП Республиканского лесного селекционного центра г.Щучинск.

Объектами исследования стали семена представителя семейства кипарисовых туи западной (*Thuja occidentalis*). Семена получены из питомника "Заречный" Краснодарского края РФ в 2015 году. Семена хранились в стандартных условиях при температуре  $+10\text{C}^0$ , в течение 6-ти месяцев. Стратификация семян проходила в герметичном, стерильном контейнере, при температуре  $+4\text{C}^0$  в течение 2-х недель.

Стерилизация проводилась 3-мя вариациями по следующим схемам:

Таблица 1 – Последовательность стерилизующих и стратификационных этапов и время экспозиции.

	Стерилизация 0,5% $\text{KMnO}_4$	Стратификация при $t+4\text{C}^0$	Стерилизация 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
1 вар.	24 часа	2 месяца	-
2 вар.	-	2 месяца	3 минуты
3 вар.	24 часа	2 месяца	3 минуты

После каждой стерилизации семена трехкратно промывались в бидистиллированной воде. Учет общего количества стерильных всходов проводили на 10 день после начала культивирования.

Для получения эксплантов использовались 2 вида питательной среды: MS (Murashige and Skoog) и WPM (Woody Plant Medium), с гормонами 6-бензиламинопурин (6-БАП) и гибберелловая кислота (ГК). В каждой из сред были использованы следующие вариации гормонов: 1) 6-БАП - 1мг/л; ГК - 0,6мг/л., 2) 6-БАП - 0,2мг/л; ГК - 0,1мг/л., 3) 6-БАП - 0,6мг/л; ГК - 0,2мг/л. Объем используемой среды в пробирке составлял 5 мл.

Семена проращивались в светлой комнате при температуре  $25-26\text{C}^0$ , освещенности 5 тыс.люксов и 16 часовом световом дне. Учет количества проросших семян проводился на 25-ый день культивирования.

В исследовании по стерилизации использовалось по 50 семян в 4-х кратной повторности. В экспериментах по изучению влияния сред на всхожесть семенного материала использовалось по 25 семян в 4-х кратной повторности.

**Результаты и обсуждение.** Наблюдение за стерильностью семян при культивировании показало, что комплексная стерилизация семян имеет наилучший стерилизующий эффект.

Как видно из таблицы 2, в первом варианте стерилизации среднее количество зараженных семян составило  $26,3 \pm 3,1(52,5\% \pm 6,3)$ , во втором варианте  $25,5 \pm 6,8(51,0\% \pm 13,5)$ . В 3-м варианте стерилизации среднее количество зараженных семян составило  $11,5 \pm 7,5(23\% \pm 15)$ . Таким образом, наилучшим методом стерилизации является комплексная стерилизация перманганатом марганца и 90% этанолом, где средний процент стерильности семян составлял

Таблица 2 – Эффективность стерилизации в различных вариантах экспериментах (количество зараженных семян).

	1-вариант	%	2-вариант	%	3-вариант	%
1-ая повтор.	20	40%	30	60%	17	34%
2-ая повтор.	27	54%	30	60%	8	16%
3-ая повтор.	27	54%	12	24%	0	0%
4-ая повтор.	31	62%	30	60%	21	42%
$\Delta\%$		$\Delta 52,5\%$		$\Delta 51,0\%$		$\Delta 23\%$

77%. При этом перманганат марганца и этанол относятся к соединениям со слабыми дезинфицирующими свойствами[4].

В опытах по получению эксплантов использовались семена прошедшие только комплексную стерилизацию. Независимо от типа питательной среды раскрытие семян наблюдали уже на 7-ые сутки.



Рисунок 1 – Проросшие семена Туи западной на седьмые сутки в среде MS

Всхожесть семян туи западной чрезвычайно низкая, поэтому проращивание осуществляли на средах с содержанием фитогормонов. Наблюдения, по проращению семян, показали что, реакция семян как в среде MS, так и в среде WPM в обеих средах была относительно одинакова, по отношению к сочетанию гормонов. Так, в первом варианте сочетания БАП и ГК, процент проращения семян на среде MS составил  $4,0\% \pm 2,0$ , на среде WPM  $5,0\% \pm 3,5$ . Во втором варианте сочетания гормонов на среде MS процент проращения был  $2,0\% \pm 2,0$ . На среде WPM  $13\% \pm 5$ , в третьем варианте на среде MS  $18\% \pm 6$ , на среде WPM  $51,0\% \pm 9,5$ . Развитие эксплантов проходило в течение 25 дней, после чего полученные асептические проростки пересаживались на безгормональную питательную среду MS и WPM для дальнейшего развития побегов растений.



Рисунок 2 – Экспланты туи западной в среде MS на 15 -е сутки после пассажа

При сравнении развития эксплантов на разных видах сред было обращено внимание, что экспланты на среде MS имели более низкие морфологические характеристики, чем на

среде WPM. Так, на среде MS экспланты имели бледно-зеленый цвет, слабую обводненную конституцию. Высота эксплантов составляла  $5,6 \pm 2,4$  см.

В отличие от среды MS экспланты на среде WPM имели интенсивную ярко-зеленую окраску, короткие междоузлия, мощный габитус. Высота эксплантов на среде WPM составляла  $4,5 \pm 1,8$  см.

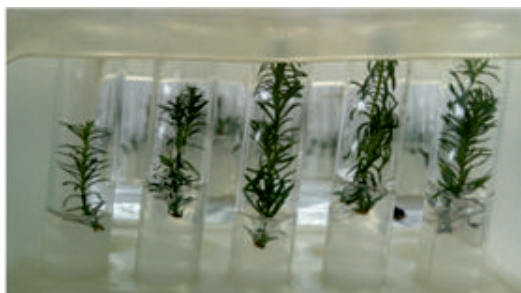


Рисунок 3 – Экспланты туи западной в среде MS на 25 -е сутки после пассажа

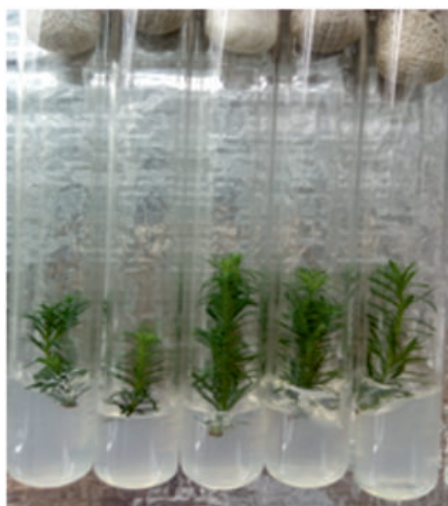


Рисунок 4 – Экспланты туи западной в среде WPM на 25 -е сутки после пассажа

Таким образом, наилучшее развитие проростков в длину наблюдается на среде MS. При этом экспланты имели более низкий уровень облиственности и интенсивность окраски листьев. На среде WPM экспланты имели более высокий уровень облиственности и окраску листьев, но меньшую высоту побегов.

На 45 день полученные экспланты были пересажены в грунт и переданы в отдел дендропитомника для дальнейшего наблюдения.



Рисунок 5 – Экспланты туи западной после пересадки в грунт на 45-е сутки

**Выводы.** На основании полученных результатов исследования, можно сделать следующие выводы:

1. Комплексная стерилизация перманганатом калия и 70% этанолом является наиболее эффективной с учетом промежуточной стратификации семян между двумя видами стерилизации. В этом случае количество зараженных семян оказалось меньшим.
2. Оптимальным вариантом среды для прорастания семян и роста эксплантов является среда WPM, содержащая 6-БАП - 0,6 мл/л; ГК - 0,2 мл/л ( прорастаемость семян составляет  $51 \pm 9\%$ ).
3. Получение проростков туи западной в асептической, культуральной среде с добавлением гормонов, без тканевого травмирования эксплантов, не приводит к пролиферации тканей зародыша и образованию каллуса.
4. На среде MS проростки имеют большую высоту, но более слабые морфологические характеристики. На среде WPM высота побегов меньше, но они имеют более мощный габитус.
5. Высадка эксплантов в грунт может быть осуществлена уже на 45 сутки после пассажа семян.

### Список литературы

- 1 Edward F. Gilman and Dennis G. Watson *Thuja occidentalis* White-Cedar // IFAS Extension:University of Florida - 1994. - С.1-3
- 2 Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Кидкин А.Ф. и др. Биотехнология. Клеточная инженерия. /Р.Г.Бутенко, М.В.Гусев, А.Ф.Кидкин - М.:Высшая Школа, 1987. -127 с.
- 3 J.V., Lesnikova N.P., Shishkin V.A. Conservation in vitro of plant genetic resources in Nikitskiy botanical garden// Biotechnology app. for explanation and preservation of plant resourses 26-31 May 2002. - Yalta: Ukraine abstracts, 2003. - P.6061.
- 4 Кодун-Иванова М.А. Микрклональное размножение быстрорастущих древесных пород в Республике Беларусь// Природные ресурсы и экология дальневосточного региона: Материалы Международного научно-практического форума. (25-26 октября 2012).- Хабаровск: Тихоокеанский государственный университет, 2013. - С. 101-105.
- 5 Мирошников А.И. Опыт использования достижений лесной генетики, селекции и семеноводства за рубежом // Лесохозяйственная информация - 2008 - №3-4 - С.4-9.
- 6 Лебедев В.Г., Булатова И.В., Шадрин Т.Е. Применение методов биотехнологии для повышения продуктивности лесных культур // Лесохозяйственная информация - 2008 - №3- 4 - С. 28-29
- 7 Шабунин Д.А., Подольская В.А., Бовичева Н.А. Получение посадочного материала быстрорастущих форм осины с использованием метода in vitro и закладка плантаций // Лесохозяйственная информация - 2008 - №3- 4 - С. 51-53.
- 8 British Herbal Pharmacopoeia. *Thuja*. // West Yorks, UK: British Herbal Medicine Association , - 1983. - С.210-211
- 9 Offergeld R, Reinecker C, Gunz E, et al. Mitogenic activity of high molecular polysaccharide fractions isolates the cupressaceae *Thuja occidentalis* L. enhanced cytokine-production thyapolsaccharide, g-fraction (TPSg) // *Leukemia* - 1992 - Vol.6 - P.189-191.
- 10 Homöpathisches Arzneibuch (HAB) *Thuja* - Monograph. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag , 1985. - P.876-877.- **статья**
- 11 Homöpathisches Arzneibuch (HAB) *Thuja* - Monograph. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag , 2003. - P.1-2.
- 12 Reitz H.D, Hergarten H. Immunmodulatoren mit pflanzlichen Wirkstoffen-2. Teil: eine wissenschaftliche Studie am Beispiel Esberitox N. // *Notabene Medici*. - 1990. - Vol.20. - P.304-306. 362-366.
- 13 Vorberg G. Bei Erkältung unspezifische Immunabwehr stimulieren. // *Ärztl Prax.* - 1984. Vol.36. - P.97-98.
- 14 von Blumröder WO. Angina lacunaris. // *Zeitschrift Fur Allgemeinmedizin* - 1985 - Vol.61 - P.271-273.
- 15 Zimmer M. Gezielte konservative Therapie der akuten Sinusitis in der HNO // *Praxis. Therapiewoche*. 1985. V. 35, P. 4024-4028.
- 16 Калинин, Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. /Ф.Л.Калинин, Г.П.Кушнир, В.В.Сарнацкая - Киев: Наук. Думка., 2004. - 228с.
- 17 Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. / Н.А.Вечернина - Барнаул:Изд-во АлтГУ, 2004 - 205с.
- 18 Молканова О.И., Стахеева Т.С., Васильева О.Г. [и др.] Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких и ценных видов растений //Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов : Материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 60-летию Гл. ботан. сада им. Н.В. Цицина РАН. (5-7 июля 2005г., г.Москва). - Москва: Объед. науч.-техн. изд-во Пушчин. НИЦ РАН, 2005. - С.354-356.

<sup>1</sup> Г.К. Зкирен, <sup>2</sup> Д.Ю. Сирман, <sup>2</sup> А.Ш. Додонова

<sup>1</sup> Солтүстік аймақ филиалында "Республикалық орман селекциялық орталығы" РМҚК, Шүччинск, Қазақстан  
<sup>2</sup> Академик Е.А.Бөкетов атындағы Қарағанды мемлекеттік университеті, Қарағанды Қазақстан

**In vitro жағдайындағы Thuja occidentalis L. асептикалық осімдік және экспланттарын алу.**

**Аннотация:** Мақалда Thuja occidentalis L. ландшафт мдіеніетінің асептикалық көшеттерін in vitro жағдайында алудың техникасын әзірлеу пәтіжелері келтірілген. Туқымдарды осы биологиясын оскере отырып, стерилизатарлар мен стелизация әдісі тасдалды. Нәтижесінде Туи көшеттерінің өсуіне және дамуына әртірлі қоректік ортадағы гармондардың концентрациясың әсері көсетілген. Көшеттердің толық дамуынан кейін, өсімдік регенераттарын одан дамыту және бақылау үшін жабық жерге көшіруге болады.

**Түйін сөздер:** Эксплант, ландшафтық мәдениет, өсу реттегіштері, қоректік орта, in vitro.

<sup>1</sup> G.K. Zkiren, <sup>2</sup> D.Yu. Sirman, <sup>2</sup> A.Sh. Dodonova

<sup>1</sup> Branch of the Northern Region of State Enterprise "National forest breeding center.", Shchuchinsk, Kazakhstan  
<sup>2</sup> Karaganda State University of the name of acadician E.A. Buketov, Karaganda, Kazakhstan

**Receiving of aseptic seedlings and explants of Thuja occidentalis L.in conditions in vitro.**

**Abstract:**The article presents the results of the development of a technique for obtaining aseptic seedlings of Thuja occidentalis L. landscape culture in vitro conditions. Sterilizers and the method of sterilization were chosen taking into account the biology of seed germination. The results of the effect of hormone concentration on the growth and development of Thuja occidentalis L. shoots in various nutrient media are presented. Plants regenerants after full development were moved to a closed ground for further observations.

**Keywords:** explant, landscape culture, growth regulators, nutrient medium, in vitro.

## References

- 1 Edward F. Gilman and Dennis G. Watson Thuja occidentalis White-Cedar. IFAS Extension:University of Florida. 1-3 (1994)
- 2 Butenko R.G., Gusev M.V., Kidkin A.F. et al Biotekhnologiya. Kletochnaya inzheneriya. [Biotechnology. Cell engineering.] (Vysshaya Shkola, Moscow, 1987)
- 3 Mitrofanova J.V., Lesnikova N.P., Shishkin V.A. Conservation in vitro of plant genetic resources in Nikitskiy botanical garden // Prirodnye resursy i ekhologiya dal'nevostochnogo regiona: Materialy Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo foruma. [Materials international scientific-practical conference Biotechnology app. for explanation and preservation of plant resources] Yalta, 2002. p. 6061
- 4 Kodun-Ivanova M.A. Mikroklonalnoe razmnozhenie bystrorastuschih drevesnyih porod v Respublike Belarus [Microclonal reproduction of fast-growing tree species in the Republic of Belarus ] Prirodnye resursy i ekologiya dal'nevostochnogo regiona: Materialy Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo foruma. [Materials international scientific-practical conference Biotechnology app. for explanation and preservation of plant resources] Habarovsk. 2013, pp. 101-105
- 5 Miroshnikov A.I. Opyit ispolzovaniya dostizheniy lesnoy genetiki, seleksii i semenovodstva za rubezhom [Experience in using the achievements of forest genetics, breeding and seed production abroad ], Leshozyaystvennaya informatsiya [Forestry information] 3(4), 4-9 (2008)
- 6 V.G. Lebedev, I.V. Bulatova, T.E. Shadrina et al. Primenenie metodov biotekhnologii dlya povyisheniya produktivnosti lesnyih kultur [The use of methods biotechnology to increase productivity of forest crops], Leshozyaystvennaya informatsiya [Forestry information] 3(4), 28-29 (2008)
- 7 Shabunin D.A., Podolskaya V.A., Bovicheva N.A. Poluchenie posadochnogo materiala bystrorastuschih form osinyi s ispolzovaniem metoda in vitro i zakladka plantatsiy [Obtaining planting material of fast-growing forms of aspen using method the in vitro and planting plantations ], Leshozyaystvennaya informatsiya [Forestry information] 3(4), 51-53 (2008)
- 8 British Herbal Pharmacopoeia. Thuja. West Yorks, UK: British Herbal Medicine Association. 210-211 (1983).
- 9 Offergeld R, Reinecker C, Gunz E, et al. Mitogenic activity of high molecular polysaccharide fractions isolates the cupressaceae Thuja occidentalis L. enhanced cytokine-production thyapolsaccharide, g-fraction (TPSg), Leukemia. 6, 189-191, (1992) .
- 10 Homöpathisches Arzneibuch (HAB) Thuja Monograph. (Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1985).
- 11 Homöpathisches Arzneibuch (HAB) Thuja Monograph. (Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2003).
- 12 Reitz H.D, Hergarten H. Immunmodulatoren mit pflanzlichen Wirkstoffen-2. Teil: eine wissenschaftliche Studie am Beispiel Esberitox N., Notabene Medici. 20, 304-306, 362-366 (1990).
- 13 Vorberg G. Bei Erkältung unspezifische Immunabwehr stimulieren.Ärztl Prax. 36, 97-98 (1984).
- 14 von Blumröder WO. Angina lacunaris. Zeitschrift Fur Allgemeinmedizin. 36, 97-98 (1984).
- 15 Zimmer M. Gezielte konservative Therapie der akuten Sinusitis in der HNO, Praxis. Therapiewoche, 35, 4024-4028 (1985).
- 16 Kalinin, F.L., Kushnir G.P., Sarnatskaya V.V. Tehnologiya mikroklonalnogo razmnozheniya rasteniy [Technology of microclonal reproduction of plants] (Nauk. Dumka, Kiev, 1992)
- 17 Vechernina N.A. Metody biotekhnologii v seleksii, razmnozhenii i sohraneni genofonda rasteniy. [Methods of biotechnology in breeding, reproduction and preservation of the gene pool of plants.] (AltGU, Barnaul, 2004).

- 18 Molkanova O.I., Staheeva T.S., Vasileva O.G. et.al. Ispolzovanie biotekhnologicheskikh metodov dlya razmnozheniya i sohraneniya redkih i tsennykh vidov rasteniy [Use of biotechnological methods for reproduction and conservation of rare and valuable plant species.]. Botanicheskie sadyi kak tsentryi sohraneniya bioraznobraziya i ratsionalnogo ispolzovaniya rastitelnykh resursov : Materialy Mezhdunar. nauch. konf., posvyasch. 60-letiyu Gl. botan. sada im. N.V. Tsitsina RAN. [Botanical gardens as centers of biodiversity conservation and sustainable use of plant resources]. Materials international scientific conference dedicated to the 60th anniversary of The main Botanical garden. N. In. Tsitsin RAS 2005, Moscow, 2005, pp.354-356.

**Сведения об авторах:**

*Зкирен Г.К.*- заведующий лабораторией филиала северного региона РГКП "Республиканский лесной селекционный центр", кордон Школьный 0, Щучинск, Казахстан.

*Сирман Д.Ю.* - магистр биологии, преподаватель кафедры ботаники Карагандинского государственного университета им. академика Е.А.Букетова, Университетская, 28, Караганда, Казахстан.

*Додонова А.Ш.* - кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники Карагандинского государственного университета им. академика Е.А.Букетова, Университетская, 28, Караганда, Казахстан.

*Zkiren G.K.* - Head of the laboratory Branch of the Northern Region of State Enterprise "National forest breeding center." Shchuchinsk Shkol'nyj cordon. 0. Qazaqstan.

*Sirman D.Yu.* - Master biology, the teaching department of botany the Karaganda State University of the name of acadecian E.A.Buketov Universitetskaia str, 28, Karaganda, Qazaqstan.

*Dodonova A.Sh.* - Candidat of biology sciences, associate professor department of botany the Karaganda State University of the name of acadecian E.A.Buketov Universitetskaia str, 28, Karaganda, Qazaqstan.

*Поступила в редакцию 15.05.2017*