

УДК 615.222:581.143.6

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ УНГЕРНІЇ ВІКТОРА (*UNGERNIA VICTORIS* VVED. EX ARTJUSHENKO)

В. А. Кунах¹Л. П. Можилевська¹О. М. Бублик¹І. В. Колоніна²В. І. Музика²¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ² ТОВ «Унгернія», Москва, Росія

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Для рідкісної лікарської рослини унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) уперше розроблено умови мікроклонального розмноження як прямою регенерацією із фрагментів лусок цибулини, так й індукуванням регенерації із калюсних тканин, що їх тривалий час вирощували *in vitro*. Підібрано також умови мультиплікації та вирощування *in vitro* одержаних мікроцибулин-регенерантів.

Ключові слова: *Ungernia victoris*, мікроклональне розмноження, пряма регенерація рослин, індукування регенерації рослин.

Багаторічна цибулинна рослина унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) — ендемічний вид родини амарилісових *Amaryllidaceae* з вузьким ареалом. Розповсюджена лише на Гіссарському хребті та його південних схилах (Таджикістан). Наразі цей вид є одним із небагатьох джерел важливого для медицини алкалоїду галантаміну, який має, зокрема, антихолінестеразну активність, а також деяких інших цінних ізохінолінових алкалоїдів, зокрема лікорину [1]. Природні запаси унгернії обмежені [2], а її інтродукція, так само як й інших представників родини амарилісових, що накопичують галантамін, не мала успіху [3].

Альтернативним джерелом сировини для отримання галантаміну, лікорину й інших важливих для медицини алкалоїдів унгернії може бути біомаса культивованих *in vitro* клітин, тканин та органів рослини. Проте в культурі тканин алкалоїди унгернії або не накопичуються, або ж кількість їх є незначною [4]. Перспективною може бути органогенна культура тканин або ж культура органів — зазвичай такі культури краще синтезують і накопичують вторинні метаболіти порівняно з неорганізованими калюсними та суспензійними культурами з незначним рівнем диференціації клітин [4].

Відомі способи мікроклонального розмноження, що їх розроблено для багатьох видів рослин [5], проте для унгернії Віктора таких даних до початку наших робіт не було.

У даній роботі наведено результати багаторічних досліджень, метою яких було вивчити можливість мікроклонального розмноження унгернії Віктора як прямою регенерацією, так й індукцією регенерації у пасивованих калюсних тканинах. Розроблення методу прямої регенерації є важливим для збереження генофонду цієї рідкісної рослини, а методу індукції регенерації із культивованих клітин — також для отримання нових форм рослин методами клітинної селекції і, можливо, для створення технології вирощування клітинної біомаси як джерела важливих для медицини алкалоїдів унгернії.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугували цибулини унгернії масою 110–165 г. Усього для введення у культуру *in vitro* використали 10 цибулин, зібраних у різні роки на південних схилах Гіссарського хребта (Таджикістан).

Цибулини, що перебували у стадії спокою, очищали від зовнішніх сухих лусок, стерилізували загальноприйнятими методами

[5], у стерильних умовах цибулину розділяли на окремі луски. Для експериментів використовували базальні (нижні) частини цибулин (приблизно 2/3 лусок), які нарізали на фрагменти розміром 0,5–1х1 см і висаджували на живильні середовища різного складу.

Усього було випробувано понад 50 варіантів живильних середовищ з мінеральною основою за Мурасіге–Скугом, Лінсмайер–Скугом, Гамборга В5, Ерікссоном, Уайтом [5–7], Воллосовичем та ін. [8] з деякими модифікаціями [9]. Мінеральну основу доповнювали вітамінами, регуляторами росту, іншими органічними добавками, зокрема сахарозою (від 2 до 5%), у багатьох випадках — мезоінозитом (20–100 мг/л), гідролізатом казеїну (50–1 000 мг/л), інколи — дріжджовим екстрактом (100–500 мг/л). У середовища вносили від 0,1 до 2 мг/л ауксинів — 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) або індолілоцтової кислоти (ІОК) у різних комбінаціях із 0,02–1 мг/л 6-фурфуріл-амінопурину (кінетину). У деяких варіантах використовували цитокінін БАП (6-бензил-

амінопурин) і гіберелову кислоту ГК₃. Застосовували також середовища, які містили лише мінеральну основу та сахарозу (середовище 5С за Воллосовичем та ін. [8]). Деякі приклади складу найуживаніших середовищ наведено в табл. 1.

Усі середовища, окрім середовища 5С, що містить тільки 1 мг/л тіаміну (вітаміну В₁), мали у своєму складі вітаміни (мг/л): В₁ (0,1–1), В₆ (0,5), РР (0,5), а також (окрім середовища В5 і 5С) — гліцин (2 мг/л). Середовище 5С0 додатково містить 0,1 мг/л БАП (бензиламінопурину) і 500 мг/л дріжджового екстракту. До складу середовищ додатково вносили агар (8 000–9 000 мг/л), рН–6,0.

Первинні експланти вирощували як у темряві, так і за штучного освітлення (1 500–2 500 лк, 16 год на добу) при 24–26 °С та відносній вологості повітря 70–80% у пробірках діаметром 2 см з робочим об'ємом 10 мл. Пасивовані калюсні тканини, а також отримані регенеранти вирощували як у пробірках, так і в конічних колбах об'ємом 250 мл з робочим об'ємом 50 мл за тих самих фізичних умов.

Таблиця 1. Склад основних типів живильних середовищ, використаних у досліді з мікроклонального розмноження *U. victoris*, мг/л

Індекс середовища	Регулятори росту*				Органічні добавки		
	2,4-Д	НОК	ІОК	кінетин	мезоінозит	гідролізат казеїну	сахароза
Середовища з мінеральною основою Мурасіге-Скуга за [6]							
МС	–	–	2	0,2	100	–	30 000
МС-1	1	–	–	0,1	100	1000	30 000
МСТ	–	2	–	1	80	500	30 000
Середовища з мінеральною основою Ерікссона за [7]							
Ер	–	1	–	0,02	–	–	40 000
Середовища з мінеральною основою Гамборга за [5]							
В5	2	–	–	–	100	–	20 000
Середовища з мінеральною основою Воллосовича та ін. за [8]							
5С	–	–	–	–	–	–	50 000
5С0	0,5	–	1	0,1	100	500	50 000
5С01	–	2	–	1	80	500	50 000
5С02	–	0,5	–	0,1	50	200	50 000
5С03	–	0,1	–	0,02	20	50	50 000
5С1	1	–	–	0,1	80	500	50 000
5С2	0,5	–	–	0,1	50	200	50 000
5С3	0,1	–	–	0,02	20	50	50 000
5С3Н	–	0,5	–	0,02	20	50	50 000
5С3І	–	–	2	0,02	20	50	50 000

* 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота; НОК — 1-нафтилоцтова кислота; ІОК — індолілоцтова кислота; кінетин — 6-фурфуріламінопурин

Візуально визначали частоту регенерації, кількість регенерантів на експлант, частоту калюсоутворення, тип росту (морфологію калюсу). Отримані результати обробляли методами статистичного аналізу [10].

Результати та обговорення

У наших досліджах утворення регенерантів на фрагментах ізольованих лусок цибулин унгернії Віктора, частота й інтенсивність калюсоутворення, а також регенерація мікроцибулинок пасивованими калюсними культурами під час вирощування в умовах освітлення були набагато гіршими порівняно з аналогічними умовами вирощування у темряві. У багатьох випадках на світлі такі процеси повністю інгібувалися. Наведені далі результати експериментів отримано у процесі вирощування без освітлення, окрім дослідів, де спеціально зазначено умови вирощування одержаних регенерантів на світлі.

Із досліджених понад 50 варіантів агаризованих живильних середовищ проліферацію та/або регенерацію вдалося індукувати в експлантів від усіх 10 вивчених цибулин на 15 варіантах середовищ, поданих у табл. 1. При цьому слід зазначити, що в різних цибулин реакція на одні й ті самі умови культивування експлантів була різною: експланти від однієї цибулини утворювали переважно калюс, від іншої — інтенсивніше формували мікроцибулинки, від третьої — поряд з калюсоутворенням і прямою регенерацією виникали коренеподібні структури, інколи — тератомоподібні утворення тощо (рис. 1). Це, очевидно, зумовлено відмінностями геномів використаних цибулин, встановлених нами методом RAPD ПЛР-аналізу [11]. Наведені далі результати є узагальненими для експлантів, отриманих від усіх 10 вихідних цибулин.

Пряма регенерація, мультиплікація та вирощування регенерантів *in vitro*. Пряму регенерацію мікроцибулинок вдалося індукувати на 14 варіантах середовищ (табл. 2). На середовищі Гамборга В5 експланти не формували регенеранти, низьким був ефект і в разі використання живильних середовищ з мінеральною основою за Мурасіге–Скугом і Ерікссоном. З частотою 15% і більше регенеранти утворювались лише на варіантах середовищ з мінеральною основою 5С за Воллосовичем та ін. [8], які містили із ауксинів НОК (0,5–2 мг/л) або ІОК (1–2 мг/л) та цитокінін кінетин (0,02–1 мг/л). Найкращими для індукції прямої регенерації були середовища 5СЗІ та 5СЗН з незначною кіль-

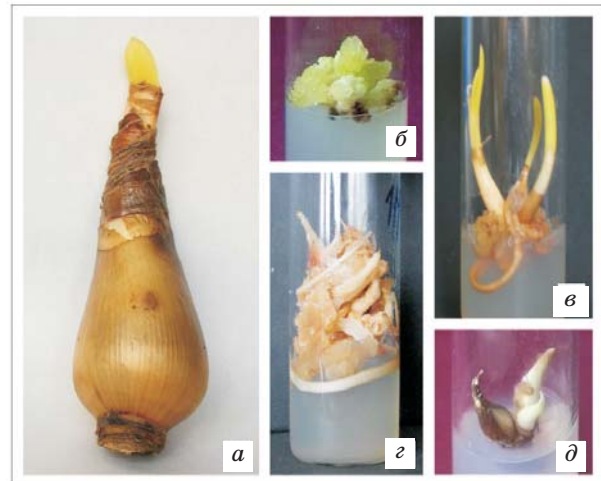


Рис. 1. Мікроклональне розмноження *U. victoris*:

a — загальний вигляд однієї із вихідних цибулин масою 120 г і віком близько 45 років, що виростає у природних умовах (південні схили Гіссарського хребта, Памір, Таджикистан);
б — первинний калюс на 60-ту добу після ізоляції фрагмента луски цибулини;
в — регенерація мікроцибулинок, яка відбувається на первинному експланті поряд з калюсоутворенням;
г — органогенна пасивована культура тканин, що спонтанно формує коренеподібні та тератомоподібні структури;
д — мікророзмноження регенерантів: пересаджена мікроцибулина (темного кольору) на середовищі 5СЗІ формує нові мікроцибулинки (світлого кольору).

кістю кінетину (0,02 мг/л) та ІОК (2 мг/л) або НОК (0,5 мг/л) (табл. 1, 2). На цих середовищах на кожному експланті, здатному до регенерації, формувалось у середньому 3–4 мікроцибулинки (табл. 1, 2; рис. 1).

Пошук умов подальшого розмноження (мультиплікації) цибулинок-регенерантів проводили на тих варіантах середовищ, які з найвищою частотою та інтенсивністю індукували пряму регенерацію. Серед них найефективнішим виявилось середовище 5СЗІ (табл. 1). Кожна окрема рослинка-регенерант на цьому середовищі через 30–40 діб утворювала 3–6 і більше нових мікроцибулин. За необхідності подальшого розмноження утворений пучок цибулин поділяли на окремі цибулинки і знову переносили на те саме середовище. Здатність регенованих цибулинок до мікророзмноження на середовищі 5СЗІ зберігалась протягом усього дослідження, тобто щонайменше 6 років.

Для прискореного розвитку окремих цибулинок найефективнішим виявилось середовище 5СЗН. На цьому середовищі в термостатованих умовах (22–26 °С) з 14–16-годинним світловим днем і з освітленням

Таблиця 2. Результати мікроклонального розмноження *U. victoris* шляхом прямої регенерації фрагментів лусок цибулин.
Сумарні дані дослідів, отримані у різні роки з десятима різними цибулинами

Індекс середовища*	Вивчені експланти, шт. **	Експланти, що регенерують мікроцибулини, %	Середня кількість мікроцибулин на експлант, що регенерує, шт.
МС	343	2,6±0,9	1,1
МС-1	613	3,1±0,7	1,2
МСТ	324	3,7±1,0	1,2
Ер	278	2,9±1,0	1,3
В5	142	0	0
5С	193	1,0±0,7	1,0
5С0	345	9,6±1,6	1,1
5С01	893	29,0±1,5	1,9
5С02	295	15,3±2,1	1,4
5С03	410	5,1±1,1	1,1
5С1	829	2,5±0,5	1,1
5С2	211	1,4±0,8	1,0
5С3	178	1,1±0,8	1,0
5С3Н	421	34,4±2,3	3,1
5С3І	450	59,1±2,3	4,1

* Склад живильного середовища наведено у табл. 1.

** У кожному варіанті досліді використано матеріал не менше ніж від трьох цибулин.

1 500–2 500 лк через 20–40 діб цибулинки формували корені та листочки і росли, а через 50–60 діб переходили до стану спокою, при цьому листочок засихав. Із перенесенням сплячої цибулинки на свіже середовище того самого складу вона знову формувала 1–3 листочки (залежно від віку цибулинки), і весь цикл повторювався. У результаті таких процесів мікроцибулини за 1,5–2,5 роки вирощування *in vitro* досягали стадії розвитку, яка відповідає віку 5–7-річних цибулинок, отриманих із насіння у разі росту їх у природних умовах.

Використання живильних середовищ іншого складу, зокрема з мінеральною основою Мурасіге–Скуга, Лінсмайер–Скуга, Гамборга В5, Еріксона, Уайта, з різною кількістю та співвідношенням органічних добавок було малоефективним: індукування регенерації мікроцибулинок спостерігали рідко (менше ніж у 1–2% експлантів), а одержані регенеранти були здатні до ефективної мультиплікації лише на середовищі 5С3І, а до подальшого росту і розвитку — на середовищі 5С3Н.

Отримання культури тканин та індукція регенерації (редиференціювання). На 15 варіантах середовищ спостерігали калюсо-

утворення з частотою від 1% до близько 80% (табл. 3). З частотою 30% і більше калюс утворювався лише на варіантах середовищ з мінеральною основою за Воллосовичем та ін. [8] та МС за Мурасіге–Скугом [6], які містили 0,5–2 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л кінетину. Досить часто первинний калюс формувався і на середовищах того самого складу з 2 мг/л НОК або 1–2 мг/л ІОК і 0,2–1 мг/л кінетину. На середовищах без 2,4-Д калюс утворювався пізніше (візуально на 60–70-ту добу росту замість 40–50-ї доби), характеризувався повільним ростом, але був органогенним і поряд з калюсом на первинних експлантах формувались окремі регенеранти-мікроцибулинки, корені, а згодом — і ризогенні структури тератомного виду (табл. 2, 3, рис. 1, 2).

У процесі пасивування та подальшого вирощування отриманих калюсних тканин на тих самих живильних середовищах, на яких їх було одержано, більшість варіантів калюсів через 5–10 пасажів темніли й гинули. Продовжували активно рости лише калюсні тканини, які були отримані та вирощувались на середовищах 5С1 і 5С01. На інших варіантах середовищ, де також спостерігали інтенсивне калюсоутворення з ви-

Таблиця 3. Частота калюсоутворення та типи первинного калюсу *U. victoris* на різних живильних середовищах.
Сумарні дані дослідів, отримані у різні роки з десятима різними цибулинами

Індекс середовища*	Вивчені експланти, шт. **	Експланти, що утворюють калюс, %, $M \pm m$	Тип калюсу, %	
			Органогенний***	Неорганізований
5С	193	1,0±0,7	100	0
5С02	295	9,8±1,7	93,1	6,9
5С3І	450	10,0±1,4	100	0
Ер	278	12,9±2,0	83,3	16,7
5СЗ	178	19,1±2,9	52,9	47,1
5СЗН	421	24,5±2,1	98,1	1,9
В5	142	26,8±3,7	23,7	76,3
МС	343	31,2±2,5	82,2	17,8
МСТ	324	34,3±2,6	67,6	32,4
5С2	211	45,5±3,4	46,9	53,1
5С0	345	44,1±2,7	52,6	47,4
5С01	893	56,3±1,7	69,4	30,6
МС-1	613	78,8±1,7	36,0	64,0
5С1	829	79,7±1,4	22,4	77,6
5С03	410	12,4±1,6	52,9	47,1

* Склад середовищ див. табл. 1.

** У кожному варіанті досліді використано матеріал не менше ніж від трьох цибулин.

*** Органогенний калюс — калюс зі сформованими цибулинками, стеблами, коренями та їхніми зачатками.

Примітка. На одному калюсі можна спостерігати різні структури, включаючи тератомоподібні. Аналіз проведено на 70–80-ту добу культивування експлантів.

сокою частотою (табл. 3), зокрема на варіантах середовищ з мінеральною основою за Гамборгом В5 та Мурасіге–Скугом (МС), тривало пасивованих тканин отримати не вдалося.

Одержані пасивовані калюсні лінії, що інтенсивно росли на зазначених вище середовищах (лінія 5С1 та лінія 5С01), відрізнялися за морфологією. Лінія 5С1 характеризувалась стабільним неорганізованим ростом, а лінія 5С01 — нижчим темпом росту і була морфогенною (генетичні, цитологічні та фізіологічні особливості цих та інших клітинних ліній унгернії Віктора наведено у роботах [12, 13]). Ці відмінності, очевидно, зумовлені різним гормональним складом живильних середовищ: лінія 5С1 була отримана й вирощувалась на середовищі з 1 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л кінетину, а лінія 5С01 — на середовищі з 2 мг/л НОК і 1 мг/л кінетину. За іншими складовими ці середовища не відрізнялись (табл. 1).

Морфогенна клітинна лінія 5С01 після перенесення її на середовище 5СЗН інтенсивно формувала мікроцибулинки. Це явище спостерігали протягом 3–4 років.

Лінія 5С1 характеризувалась неорганізованим типом росту. У разі перенесення її після 2–7 пасажів на середовище 5С01 також спостерігали неорганізований ріст, однак на середовищі 5СЗН вона упродовж 6 років виявляла здатність до регенерації мікроцибулинок.

У результаті викладених і низки інших дослідів, дані яких тут не наведено, було встановлено й у подальших дослідях підтверджено, що оптимальним середовищем для індукції калюсоутворення і подальшого вирощування калюсних тканин унгернії Віктора є середовище 5С1. Калюс, отриманий на цьому середовищі, після перенесення через 2–7 пасажів на середовище 5СЗН і під час подальшого вирощування на ньому постійно регенерує мікроцибулинки. Той самий калюс після перенесення на середовище 5С01 може тривалий час вирощуватись на цьому середовищі у вигляді морфологічно гомогенної тканини як на твердому (агаризованому) середовищі, так і в рідкому середовищі на шейкерах. Цей калюс у разі перенесення на середовище 5СЗН здатен регенерувати рослини протягом не менше 6 років. Описану

ЛІТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. — В 2-х томах. — М.: Медицина, 1985. — 1 000 с.
2. *Ходжиматов М.* Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. — Душанбе: Гл. научн. ред. Тадж. Сов. Энциклопедии, 1989. — 368 с.
3. *Черкасов О. А., Майсурадзе Н. И., Глызина Г. С., Гаевский А. В.* Содержание галантамина в некоторых сортах *Narcissus hybridus* Hort. // Раст. ресурсы. — 1993, Вып. 4. — С. 81–87.
4. *Кунах В. А.* Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. *Кушнір Г. П., Сарнацька В. В.* Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика // К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
6. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* — 1962. — V. 15, N13. — P. 473–497.
7. *Eriksson T.* Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haemaphysalis gracilis* // *Ibid.* — 1965. — V. 18. — P. 976–993.
8. *Волосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А.* Оптимизация состава макросолей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Vent. // Раст. ресурсы. — 1979. — Т. 15, №4. — С. 516–526.
9. *Пат. 10338UA, 5МПК C12№5/00, C12№5/02.* Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин / В. А. Кунах, Л. К. Алпатова, Л. П. Можилевська — Заявл. 19.03.1993; Опубл. 25.12.1996, Бюл. №4.
10. *Рокицкий П. Ф.* Введение в статистическую генетику. — Минск: Высшая школа, 1974. — 448 с.
11. *Бублик О. М., Андреев И. О., Спиридонова К. В., Музыка В. И. та ін.* Генетична гетерогенність рідкісного ендемічного виду *Ungernia victoris* (*Amaryllidaceae*): RAPD-аналіз // Укр. ботан. журн. — 2008. — Т. 65, № 3. — С. 445–452.
12. *Кунах В. А., Можилевская Л. П., Потапчук Е. А., Музыка В. И. и др.* Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология. — 2007. — № 1. — С. 14–21.
13. *Бублик О. М., Андреев И. О., Спиридонова К. В., Кунах В. А.* Мінливість морфогенної та неморфогенної культури тканин *Ungernia victoris* за результатами RAPD-ПЛР // Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 44–51.

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ
УНГЕРНИЙ ВИКТОРА (UNGERNIA VICTORIS
VVED. EX ARTJUSCHENKO)**

V. A. Kunakh¹
L. P. Mozhylevska¹
O. M. Bublyk¹
I. V. Kolonina²
V. I. Muzyka²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ
² ООО «Унгернія», Москва, Росія

Для редкого лікарського рослини *Ungernia victoris* вперше розроблені умови мікроклонального розмноження як прямої регенерації з фрагментів чешуек луковичи, так і індукцією регенерації з калюсних тканин, довготривало вирощуваних *in vitro*. Підібрані також умови мультиплікації і вирощування *in vitro* отриманих мікролуковиц-регенерантів.

Ключевые слова: *Ungernia victoris*, мікроклональне розмноження, пряма регенерація рослин, індукція регенерації рослин.

**MICROCLONAL PROPAGATION
OF UNGERNIA VICTORIS VVED. EX
ARTJUSCHENKO**

V. A. Kunakh¹
L. P. Mozhylevska¹
O. M. Bublyk¹
I. V. Kolonina²
V. I. Muzyka²

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
² LTD «Ungernia», Moscow, Russia

Approaches to microclonal propagation of the rare medicinal plant *Ungernia victoris* both through the direct regeneration from the scale of bulb and via induction of regeneration from the long-term grown *in vitro* callus tissues have been developed for the first time ever. Conditions for multiplication and maintenance of *in vitro* generated microbulb-regenerants were specified as well.

Key words: *Ungernia victoris*, microclonal propagation, direct plant regeneration, induction of plant regeneration.