

ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *EUSOMMIA ULMOIDES* OLIVER УКРАЇНСЬКОГО ПОЛІССЯ

С. Ю. БІЛОУС, кандидат біологічних наук, доцент,
orcid.org/0000-0002-1682-5352

О. О. ОЛІЙНИК, завідувач лабораторії біотехнології та клітинної інженерії,
orcid.org/0000-0002-3591-3518

А. А. КЛЮВАДЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: forest_biotech@nubip.edu.ua

Культивування раритетних видів рослин світової флори з метою збереження їхнього генофонду є одним із основних завдань сучасності. Нині методи *in vitro* у поєднанні з *ex situ* стають дедалі важливішими засобами збереження та підтримання рівня стабільності фіторізноманіття. *Eusommia ulmoides* Oliv. – листопадне дводомне дерево родини Евкомієві (*Eusommiaceae*). Цей деревний вид зростає на території арборетуму НУБіП України у єдиному екземплярі, є цінним декоративним інтродуцентом і має низку лікарських властивостей. Нині перебуває у не найкращому стані й потребує лікування й розмноження із метою збереження.

Метою дослідження було розроблення біотехнології мікроклонального розмноження рослин *E. ulmoides* Oliv. на початкових етапах розмноження для використання оздоровлених регенерантів у озелененні й культивуванні у ботанічних садах. Обґрунтовано актуальність мікроклонального розмноження *E. ulmoides* Oliv. Наведено особливості введення в культуру *in vitro* *E. ulmoides* Oliv. з використанням різних стерилізувальних речовин, типів експлантів та умов вирощування. Для культивування різних типів пагонів завдовжки 15–25 см з апікальними та латеральними бруньками евкомії в'язолістої використовували живильні середовища Мурасіге–Скуга (MS) і Драйвера (DKW) з додаванням до їх складу цитокінінів і ауксинів: 6-БАП (6-бензиламінопурин), НОК (α-нафтилоцтова кислота) та ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота) як окремо, так і комбінуючи їх.

У результаті проведених досліджень відпрацьовано методіку стерилізації експлантів *Eusommia ulmoides* Oliver з ефективністю 78 % унаслідок поверхневої стерилізації 0,1 % HgCl_2 на однорічних пагонах. Вивчено вплив різних варіантів стерилізації на розвиток мікропагонів *Eusommia ulmoides* Oliver. Встановлено оптимальні живильні середовища на етапі введення у культуру *in vitro* *Eusommia ulmoides* Oliver. Зокрема, для мікроклонального розмноження евкомії на початкових етапах рекомендовано живильне середовище MS 1 із додаванням 0,5 мг·л⁻¹ БАП та 0,1 мг·л⁻¹ НОК.

Ключові слова: *Eusommia ulmoides* Oliver, мікроклональне розмноження, експлантат, живильне середовище, рослина-регенерант, морфогенез, *in vitro*.

Актуальність та аналіз останніх досліджень. Культивування раритетних видів рослин світової флори з метою збереження їхнього генофонду є одним із основних завдань сучасності, оскільки спричинені людиною зміни призвели до деградації та фрагментації природних ареалів, що супроводжуються втратою видів і зменшенням генетичного різноманіття (Chornobrov et al., 2019; Kunakh, 2005; Belokurova, 2010).

Необхідність збереження біорізноманіття традиційно пов'язують з етноботанічним використанням рослин як джерела їжі, медикаментів, волокон, будівельних матеріалів, для задоволення культурних потреб. Крім того, рослини відіграють безпосередню роль у створенні широкого спектра життєво необхідних для людини умов існування (якість повітря, регуляція якості ґрунтів та води, утилізація токсичних відходів тощо) (Wang et al., 2016).

Eucommia ulmoides Oliver – листопадне дводомне дерево родини Евкомієві (*Eucommiaceae*), заввишки до 40 м із могутньою кореневою системою і розвинутою коренистою кроною. Зовнішня поверхня кори пагонів матова, гладенька або злегка зморщена. Кора багаторічних гілок і стовбура сильно зморщена, іноді із поперековими тріщинами. Пагони вкриті черговими еліптичними, яйцеподібними або довгасто-яйцеподібними дрібнозубчатыми листками. З верхньої сторони листки темно-зелені голі, а з нижньої уздовж жилок слабоопушені, світліші, до 2 см на черешках. При переломі листків і кори видно численні витягнуті сріблясто-білі тонкі, еластичні нитки гутаперчі (Sih et al., 1976).

Евкомія в'язолиста – єдиний вид рослини монотипного сімейства

Eucommia ulmoides, яку занесено в Червоний список Міжнародної спілки охорони природи видів, яким загрожує зникнення. Станом на 2018 рік статус «VU» – вразливий. Ареал розташування евкомії – Китаї, здебільшого вздовж річки Янцзи, в її середній течії. Евкомія росте на висоті від 300 до 2500 м над рівнем моря, переважно у субтропічних лісах. Поодинокі дерева трапляються і набагато нижче. Вважають, що в дикому вигляді евкомія збереглася у лісах Шеньсі, Ганьсу, Аньхоя і Чжецзянь (Kim et al., 2004). Кора та листя містять пінорезинол диглюкозид – потужний антигіпертензивний фармацевтичний препарат, відомий серед китайців як тучунг (He et al., 2014; Deyama et al., 2001). Основною сполукою, яку виділяють із рослинного матеріалу евкомії, є гутаперча, що підсилює електроізоляційну властивість гуми. Ця смола міститься в усіх органах і тканинах рослини (Wang et al., 2016; Kim et al., 2004; Sih et al., 1976).

Цей деревний вид зростає на території арборетуму НУБІП України у єдиному екземплярі, є цінним декоративним інтродуцентом і має низку лікарських властивостей. Нині перебуває у не найкращому стані й потребує лікування і розмноження з метою збереження.

Актуальність розробки технології розмноження саме цього виду *in vitro* пов'язана з тим, що традиційні методи мають певні недоліки, оскільки евкомія може розмножуватись насінням, але часто воно є недоступним у кількості, необхідній для посадки великих площ. Стебловими живцями можуть розмножуватись лише дерева молодого віку, й приживлюваність рослин є низькою (Zhang & Li, 1984).

Тому актуальним є використання способу мікроклонального розмно-

ження (МКР) на основі культури ізолюваних тканин, основним завданням якого є отримання за мінімальної кількості маточних рослин у короткі терміни великої кількості морфологічно стабільного та генетичного однорідного садивного матеріалу.

Введення в культуру *in vitro* є одним із важливих етапів мікрোকлонального розмноження (МКР), успіх якого залежить від багатьох чинників: періоду відбирання рослинного матеріалу, стерилізувального розчину, підбирання ефективного способу стерилізації рослинного матеріалу та компонентів живильного середовища для успішної мультиплікації рослин.

Мета роботи: підібрати стерилізувальний розчин, схему стерилізації рослинного матеріалу та компонентів живильного середовища для отримання асептичних, життєздатних рослин-регенерантів.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведено у лабораторії біотехнології та клітинної інженерії Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України). Для роботи використовували пагони завдовжки 15–25 см з апікальними та латеральними бруньками, відібрані з донорної рослини в лютому – березні (у Ботанічному саду НУБіП України), які поміщали в термошафу на 14 діб для пророщування ($T = 24 \pm 2^\circ\text{C}$) (рис. 1), однорічні прирости евкомії в'язолистої – у квітні – травні (до початку здерев'яніння пагонів) (рис. 2).

За добу до початку стерилізації рослинний матеріал обробляли розчином фунгіциду й витримували в термошафі за температури $24 \pm 2^\circ\text{C}$ і 16-годинного фотоперіоду.

Експлантати відмивали від поверхневих забруднень у мильному

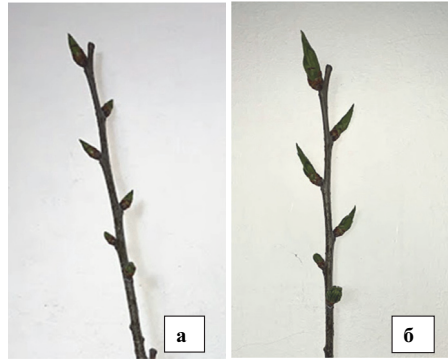


Рис. 1. Здерев'янілі пагони евкомії в'язолистої перед уведенням у культуру *in vitro*:

а – до поміщення у термошафу;
б – через 14 діб у термошафі

розчині з додаванням декількох крапель Твін-20 на шейкерній мішалці протягом 30 хв, потім промивали під проточною водою (30 хв). Для стерилізації використовували розчин 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl_2) з часом експозиції 5, 10, 15 хв і 30 % розчин пероксиду водню (H_2O_2) з часом експозиції 10, 15, 20 хв. Для підвищення впливу стериліанта експлантати попередньо занурювали у 70 % етиловий спирт на 60 с. Стерильний матеріал тричі промивали автоклавованим дистилатом (тричі по 10 хв) та переносили на стерильні чашки Петрі з фільтрувальним папером. Видаляли відмерлі тканини (або зі слідами опіків), висаджували на живильне середовище Мурасіге–Скуга (Murashige & Skoog, 1962) без регуляторів росту.

Для культивування евкомії в'язолистої використовували живильні середовища Мурасіге–Скуга (MS) і Драйвера (DKW) (Rahman, 2018) з додаванням до їх складу цитокинінів і ауксинів: 6-БАП (6-бензиламінопурин), НОК (α -нафтилоцтова кислота) та ІОК (β -індоліл-3-оцтова

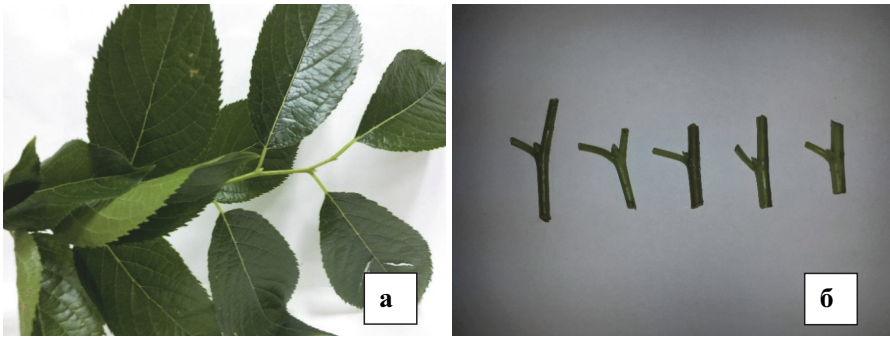


Рис. 2. Вихідні експланти *Eucommia ulmoides* Oliver:
а – весняний пагін; б – частини пагонів із латеральними бруньками

кислота) як окремо, так і комбінуючи їх. Додатково до середовища додавали сахарозу (0,3 %), мезоінозит (100 мг/л) та агар (0,7 %), рН середовища – 5,7–5,8.

Упродовж семи діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантатів. Життєздатність введених експлантатів оцінювали через 25 діб.

Експлантати культивували за освітлення 3–4 тис. лк, $T = 24 \pm 2^\circ\text{C}$, із вологістю повітря $\sim 70\%$ та 16-годинним фотоперіодом.

Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували згідно із загальноприйнятими методиками.

Результати дослідження та їх обговорення. На ефективність введення рослин у культуру *in vitro* впливають різні фактори, зокрема: тип стерилізувальної речовини, тривалість оброблення нею та фаза росту донорської рослини. Оскільки у нашому досліді було використано пагони двох зразків, ефективність стерилізації була нижчою у здерев'янілих пагонів. Аналізуючи кількість стерильних та інфікованих експлантатів, після застосування стерилізаторів встановили, що найменш ефектив-

ним є використання 0,1 % розчину дихлориду ртуті з часом експозиції 5 та 15 хв. Досить високий відсоток стерильних експлантатів – 30 % – отримано за використання розчину пероксиду водню, однак зі зростанням часу стерилізації зменшувалась життєздатність рослин (рис. 3).

Найкращі показники стерильних і життєздатних експлантатів було отримано за використання 0,1 % розчину дихлориду ртуті з часом експозиції 10 хв (рис. 4).

Більшість зразків було інфіковано грибами. Зважаючи на вік дерева, з якого відбирали пагони, можливим поясненням є довготривалий розвиток і проникнення міцелію грибів у глибші шари тканин дерева.

Вищий відсоток стерильних і життєздатних експлантатів отримали за використання однорічних пагонів. Для них ефективним було застосування 0,1 % розчину дихлориду ртуті з часом експозиції 10 хв, 30 % розчину пероксиду водню – 10 та 15 хв (рис. 5).

З огляду на той факт, що пероксид водню досить швидко розкладається і менше уражує тканини рослин, його використання на етапі введення однорічних пагонів у культуру *in vitro* є більш ефективним (рис. 6).

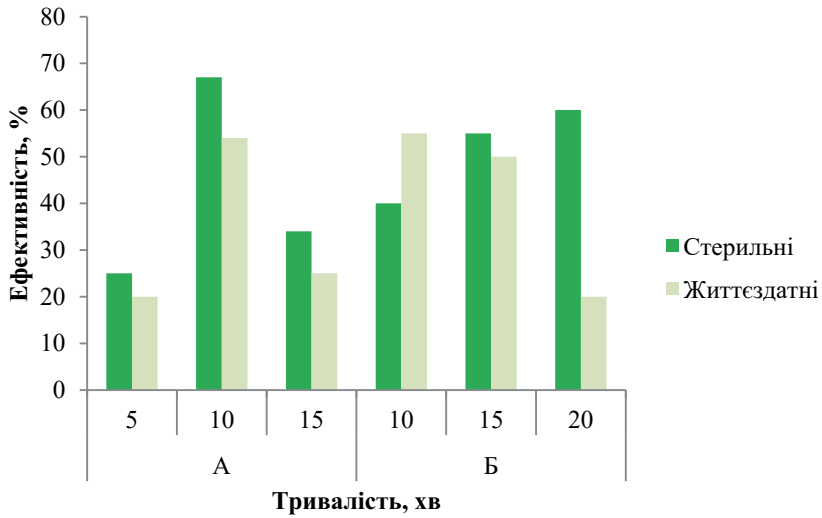


Рис. 3. Ефективність стерилізації здерев'янілих пагонів евкомії в'язолистої за використання різних стерилізувальних розчинів та часу експозиції: А – 0,1 % розчин дихлориду ртуті; Б – 30 % розчин перексиду водню

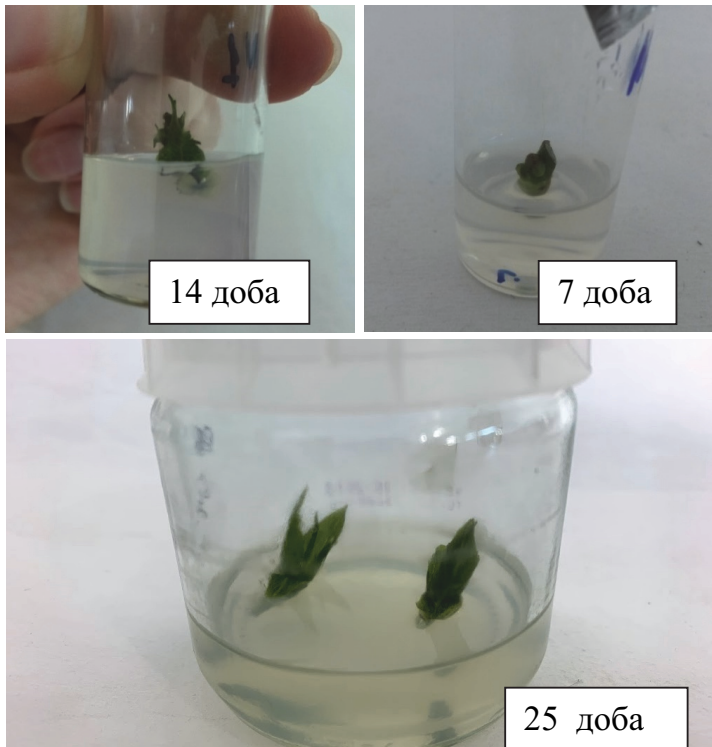


Рис. 4. Стерильні, життєздатні експлантати евкомії в'язолистої (стерилізувальна речовина 0,1 % HgCl_2 , 10 хв)

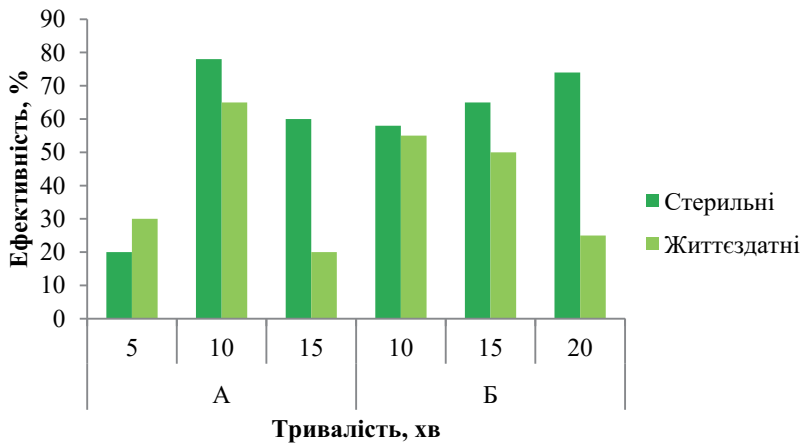


Рис. 5. Ефективність стерилізації однорічних пагонів евкомії в'язолистої за використання різних стерилізувальних розчинів та часу експозиції:

А – 0,1 % розчин дихлориду ртуті; Б – 30 % розчин перекису водню

Стерильні експлантати культивували на різних живильних середовищах, доповнених регуляторами росту. Оцінювання ефективності середовищ та облік коефіцієнта розмноження проводили після другого пасажу. Численні дослідження дали змогу відібрати оптимальні середовища, які забезпечували коефіцієнт розмноження більше двох (табл. 1).

У результаті було відібрано три варіанти компонентного складу гормонів росту рослин, які протестували на

двох базових живильних середовищах – MS і DKW. Культивування рослин на середовищі MS 2 і DKW 2 спричиняло розвиток незначної кількості пагонів і придаткових бруньок, що характеризувались уповільненим ростом. Застосування DKW 3 із $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП без додавання ауксинів сприяло утворенню максимальної кількості пагонів, середня довжина яких становила 1,19 см (рис. 7). На живильному середовищі MS 1 із додаванням $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП та $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК

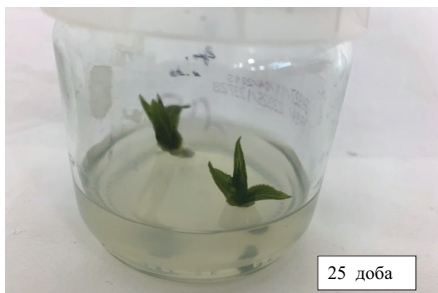


Рис. 6. Стерильні, життєздатні експлантати евкомії в'язолистої (стерилізувальна речовина – 30 % H_2O_2 , 15 хв)



Рис. 7. Рослина-регенерант евкомії в'язолистої на живильному середовищі DKW 3 із $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП (30 доба культивування)

спостерігали активний ріст мікропагонів, збільшення кількості міжвузлів. Культивування експлантатів на цьому середовищі забезпечило розвиток як центрального, так і формування додаткових адвентивних пагонів на 18–24 добу культивування.

Висновки і перспективи. Проведені дослідження дали змогу отримати життєздатні асептичні мікропагони *in vitro* *Eucommia ulmoides* Oliver. Триває вивчення факторів, які впливають на регенерацію мікропагонів у вертикальній площині, стабілізації та оптимізації умов вирощування. Проводяться спостереження за реалізацією морфогенетичного потенціалу експлантатів на різних складових живильного середовища для дослідження особливостей органогенезу евкомії в'язолистої в умовах *in vitro*, підбір способів укорінення отриманих рослин-регенерантів та їх адаптації в умовах *ex situ*.

У результаті проведених досліджень відпрацьовано методику стерилізації експлантатів *Eucommia ulmoides* Oliver з ефективністю 78 % унаслідок поверхневої стерилізації 0,1 % розчином дихлориду ртуті на однорічних пагонах.

Вивчено вплив різних варіантів стерилізації на розвиток мікропагонів *Eucommia ulmoides* Oliver.

Підібрано оптимальне живильне середовище на етапі введення у культуру *in vitro* *Eucommia ulmoides* Oliver. Зокрема для мікроклонального розмноження евкомії на початкових етапах рекомендовано живильне середовище MS 1 із додаванням 0,5 мг·л⁻¹ БАП та 0,1 мг·л⁻¹ НОК.

Список літератури

Belokurova, V. (2010). Biotechnology methods in system of preservation plant biodiversi-

ty. *Cytology and genetics*, 44 (3), 58–72 [in Ukrainian].

Chornobrov, O., Bilous, S., Chornobrov, O., & Manko, M. (2019). Peculiarities of morphogenesis of the endangered species of willow (*Salix* spp.) *in vitro*. *Biologija*, 65 (1), 48–55.

Deyama, T., Nishibe, S., & Nakazawa, Y. (2001). Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta pharmacologica Sinica*, 22 (12), 1057–70.

He, X., Wang, J., Li, M., Hao, D., Yang, Y., Zhang, C., He, R., & Tao, R. (2014). *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 151 (1), 78–92.

Kim, H. Y., Moon, B. H., Lee, H. J., & Choi, D. H. (2004). Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93 (2–3), 227–230. doi:10.1016/j.jep.2004.03.047.

Kunakh, V. (2005). *Biotechnology herbs. Genetic and physiological and biochemical bases*. Kyiv: Logos [in Ukrainian].

Murashige, T. A., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phyiol. Plant.*, 15 (13), 473–497.

Nakazawa, Y., & Toda, Y. (1995). Cite as *Eucommia ulmoides* Oliv. (*Eucommiaceae*): *In Vitro* Culture and the Production of Iridoids, Lignans, and Other Secondary Metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants*, VIII (33), 215–231.

Rahman, S. S. (2018). DKW emerges as a superior media factor *in vitro* plantregeneration. *Agri.*, 1 (1), 3–4.

Rong, Z., Ya-Lei, P., Shi-Jie, H., Xiang-He, K., Wang, J., & Qi-Bing, M. (2014). Effects of total lignans from *Eucommia ulmoides* barks prevent bone loss *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 (1), 104–112 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.031i>.

- Sih, C. J., Ravikumar, P. R., Huang, F.-C., et al. (1976). Isolation and synthesis of pinorelinol diglucoside, a major antihypertensive principle of tuchung (*Eucommia ulmoides* Oliver). *Am. Chem. Soc.*, 98, 5412–5413.
- Wang, J.-Y., Yuan, Y., Chen, X.-J., Fu, S.-G., Zhang, L., Hong, Y.-L., & Yang, Y.-Q. (2016). Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synovocyte proliferation and osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 609–616. doi:10.1016/j.jep.2016.10.038
- Xinying, Z., & Zhengli, L. (1984). Studies on the phloem of *Eucommia ulmoides* *in vitro*. *Science in China Series B-Chemistry, Biological, Agricultural, Medical & Earth Sciences*, 27 (7), 671–678. <https://doi.org/10.1360/yb1984-27-7-67>

S. Yu. Bilous, O. O. Oliynyk, A. A. Klyuvadenko (2019). Obtaining aseptic culture of *Eucommia Ulmoides* Oliver. UKRAINIAN JOURNAL OF FOREST AND WOOD SCIENCE, 10(4):26-33. <https://doi.org/10.31548/forest2019.04.026>.

Cultivation of rare flora species in order to preserve their gene pool is one of the main tasks of our time. In vitro methods, in combination with ex situ, are nowadays becoming increasingly important means of supporting and maintaining the level of phytodiversity stability. Eucommia ulmoides Oliver is a deciduous tree, belongs to the Eucommiaceae family. This tree species grows in the territory of the NULES of Ukraine Arboretum in a single copy, is a valuable decorative introducer and has a number of medicinal properties. It is currently in poor condition and needs treatment and reproduction for preservation.

The purpose of the study was to develop biotechnology of microclonal propagation of E. ulmoides Oliv plants in the initial stages of reproduction for using healthy plant-materials in landscaping and cultivation in botanical gardens.

The relevance of microclonal reproduction of E. ulmoides Oliv is substantiated. Features of introduction into culture of E. ulmoides Oliv were established with using various sterilizing agents, types of explants and growing conditions. Different types of shoots 15–25 cm long with apical and lateral buds, selected from the donor plant in February – March were used for the work. Murasighe & Skoog (MS) and Driver (DKW) nutrient media were used for cultivation of Eucommia, with cytokinins and auxins addition to their composition: 6-BA (6-benzylaminopurine), NAC (α -naphthylacetic acid) and IAA (β -indolyl-3-acetic acid) both individually and in combination. Sucrose (0.3 %), mesoinositol (100 mg / l) and agar (0.7 %) were added to the medium, the pH of the medium was 5.7–5.8.

The influence of different sterilization variants on the development of Eucommia ulmoides Oliver microshoots has been studied. As a result of the research the technique of sterilization of E. ulmoides Oliv explants with 78 % efficiency due to surface sterilization of 0.1 % HgCl₂ on annual shoots has been worked out. Optimal nutrient media were established at the stage of in vitro culture of E. ulmoides Oliv. In particular, for the microclonal reproduction of E. ulmoides Oliv., the nutrient medium MS 1 supplemented with 0.5 mg·l⁻¹ BA and 0.1 mg·l⁻¹ NAA is recommended in the initial stages.

Keywords: *Eucommia ulmoides Oliver, microclonal propagation, explant, nutrient medium, plant regenerant, morphogenesis, in vitro.*

Отримано: 2019-11-24