

## ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *in vitro* ТКАНИН *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko

О. М. Бублик  
І. О. Андреев  
К. В. Спіридонова  
Л. П. Можилевська  
В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Отримано 15.03.2011

Два живильні середовища, запропоновані раніше для культивування *in vitro* тканин рідкісної лікарської рослини *Ungernia victoris*, оцінено за показниками ефективності прямої регенерації та калюсоутворення, а також генетичної мінливості регенерантів, органогенної та неорганогенної культур тканини за умов тривалого культивування. Встановлено, що середовище 5C1 придатне переважно для отримання калюсу, тоді як середовище 5C01 можна ефективно використовувати для одержання як калюсу, так і регенерантів, та їх пролонгованого культивування. Обидва середовища забезпечують порівняно низький рівень генетичної мінливості. Результати дослідження свідчать про високу ефективність розроблених методик отримання культивованих тканин та мікроклонального розмноження *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko.

**Ключові слова:** *Ungernia victoris*, мікроклональне розмноження, культура тканин *in vitro*, соматклональна мінливість.

Унгернія Віктора, *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko (*Amarylidaceae*) — рідкісна ендемічна рослина, що трапляється лише в гірських районах Таджикистану й Узбекистану. Її ізохінолінові алкалоїди використовують для лікування захворювань травної і дихальної систем та опорно-рухового апарату [1].

Природна сировинна база унгернії Віктора обмежена, актуальними є проблеми збереження генофонду виду, прискореного розмноження, а також створення альтернативних джерел біомаси для одержання алкалоїдів. Ефективно вирішити ці завдання дозволяє культура тканин *in vitro*. Раніше нами було розроблено методики та живильні середовища для отримання і тривалого культивування калюсної культури, а також мікроклонального розмноження *U. victoris* [2]. Розроблений метод регенерації має безпосереднє значення для збереження генофонду цієї рослини, уможливорює створення методами клітинної селекції нових форм рослин, а також технології вирощування клітинної біомаси як джерела важливих для медицини алкалоїдів унгернії. Однак культивування клітин *in vitro* часто супроводжується виникненням різноманітних геномних змін — так званої соматклональної варіабельності.

Остання є джерелом генетичного різноманіття, що може бути корисним для створення культур-продуцентів біологічно активних речовин, проте є перешкодою для їх тривалого стабільного культивування та мікроклонального розмноження [3]. Саме тому розроблення методик культивування *in vitro* та оцінювання ефективності живильних середовищ потребують визначення не лише придатності їх для отримання бажаного матеріалу в достатній кількості, але й вивчення його генетичної стабільності. З метою подальшої оптимізації способів збереження генофонду *U. victoris* ми провели додаткові комплексні дослідження, обравши для роботи серед випробуваних раніше варіантів середовищ два найефективніших для індукції калюсогенезу, регенерації та тривалого культивування калюсних тканин. Оцінювали живильні середовища за показниками ефективності прямої регенерації та калюсоутворення, а також генетичної мінливості регенерантів, органогенної та неорганогенної культури за умов тривалого культивування.

### Матеріали і методи

Для досліджень використали рослину *U. victoris* із природної популяції (південний

схил Гіссарського хребта, Памір, Таджикистан). Культуру тканин отримували із фрагментів базальної частини цибулини за описаною раніше методикою [2]. Індукцію калюсогенезу, регенерацію та тривале культивування калюсної культури здійснювали на двох варіантах середовища 5С, які мали мінеральну основу за Воллосовичем та ін. [4] з деякими модифікаціями [5] (таблиця). Культивування проводили в темряві при температурі  $25 \pm 1$  °С. Тривалість пасажу становила 28–30 днів.

**Склад живильних середовищ, використаних для індукції калюсоутворення, регенерації та тривалого культивування калюсної культури *U. victoris* [5]**

Середовище	Склад	
	5С1	5С01
Фітогормони: 2,4-Д НОК кінетин	1 мг/л – 0,1 мг/л	– 2 мг/л 1 мг/л
Макроелементи	5С	
Мікроелементи	МС	
Тіамін	1 мг/л	
Піридоксин	0,5 мг/л	
Нікотинова кислота	0,5 мг/л	
Гліцин	2 мг/л	
Мезоінозит	80 мг/л	
Гідролізат казеїну	500 мг/л	
Fe-хелат	5 мл/л	
Сахароза	5 %	
Агар	9 г/л	

Примітка: 5С — макроелементи за Воллосовичем та ін. [4], МС — мікроелементи за Мурасіге–Скугом [6].

Ефективність середовищ для калюсоутворення та регенерації у зв'язку з повільним проходженням цих процесів оцінювали через 6 місяців після введення в культуру *in vitro*, підраховуючи відносну кількість експлантів, що дали початок калюсам або регенерантам. Для статистичної обробки даних послуговувалися загальноприйнятою методикою обрахунку довірчого інтервалу для якісної мінливості із заданим значенням достовірності 95 % [7].

Для молекулярно-генетичного аналізу використовували морфогенну й неморфогенну культуру тканин віком 1, 2 і 3 роки та регенеранти — до одного року. Генетичну стабільність оцінювали, порівнюючи з контролем — материнською рослиною. Виділення ДНК і полімеразну ланцюгову реакцію з випадковими праймерами (RAPD-ПЛР) проводили за описаними методиками з підібраними раніше праймерами [8]. Для кількісної оцінки поліморфізму електрофоре-

тичні спектри продуктів RAPD-ПЛР представляли у вигляді бінарної матриці, в якій наявність або відсутність однакових за розміром ампліконів, а також їхні відтворювані кількісні відмінності за інтенсивністю флуоресценції позначали відповідно «1» або «0». На підставі отриманої матриці визначили генетичні відстані Жакарда за допомогою комп'ютерної програми FAMD [9].

Статистичну достовірність різниці між рівнями генетичних змін калюсів (за показником генетичних відстаней) різного віку та з різних живильних середовищ визначали за методом парного *t*-критерію [10].

## Результати та обговорення

### Ефективність прямої регенерації та калюсоутворення

У процесі культивування експлантів *U. victoris in vitro* на обох середовищах спостерігали процеси калюсогенезу і/або прямої регенерації, в іншому випадку експланти поступово темніли й гинули. Після шести місяців культивування частка експлантів, що загинули, на середовищі 5С01 досягла  $13,8 \pm 3,6\%$  проти  $39,4 \pm 1,8\%$  на 5С1. На середовищі 5С1 із 137 експлантів у 76 випадках ( $55,5 \pm 1,8\%$ ) спостерігали калюсоутворення, в чотирьох ( $2,9 \pm 1,8\%$ ) — калюсоутворення і регенерацію, а в трьох ( $2,2 \pm 1,8\%$ ) — лише регенерацію (рис. 1). Загалом, на 5С1 частота калюсоутворення становила  $58,4 \pm 8,3\%$ , прямої регенерації —  $5,1 \pm 3,7\%$ . На середовищі 5С01 із 174 висаджених експлантів у 81 випадку ( $46,5 \pm 3,6\%$ ) відбувалося калюсоутворення і регенерація, у 21 ( $12,1 \pm 3,6\%$ ) — тільки регенерація. Отже, на 5С01 частота калюсоутворення склала  $74,1 \pm 6,5\%$ , прямої регенерації —  $39,7 \pm 7,3\%$ . Достовірність відмінностей між середовищами 5С1 та 5С01 за ефективністю калюсогенезу та морфогенезу підтверджується відсутністю перекривання довірчих інтервалів для частот кожного з процесів (рис. 1).

Під час регенерації спостерігали утворення цибулинок (рис. 2, а) або ризогенез (рис. 2, б). На середовищі 5С01 42 ( $24,1\%$ ) експланти сформували мікроцибулини, а 27 ( $15,5\%$ ) — ризогенну культуру; на 5С1 ці показники становили відповідно 6 ( $4,4\%$ ) і 1 ( $0,7\%$ ). Регенеранти на середовищі 5С1 поступово гинули, що свідчить про його непридатність для тривалого культивування рослин, натомість середовище 5С01 забезпечувало ріст рослин-регенерантів упродовж тривалого часу.

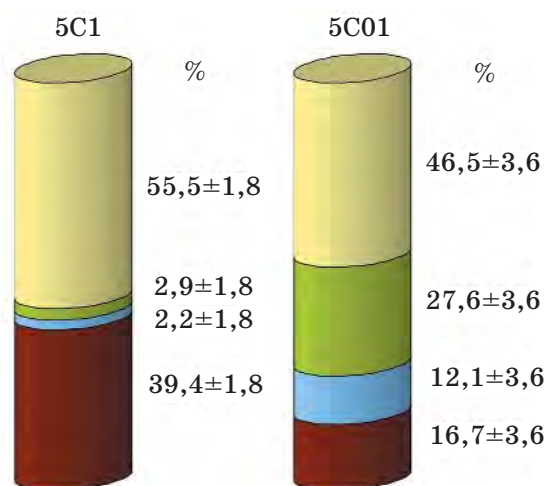


Рис. 1. Частота процесів калюсогенезу та регенерації *U. victoris* на живильних середовищах 5C1 і 5C01.

Частка експлантів (%), у яких відбувалися:

- — калюсогенез;
- — калюсогенез і регенерація;
- — регенерація;
- — загиблі експланти

Обидва живильні середовища не лише стимулювали дедиференціювання клітин експлантата, а й сприяли подальшій проліферації, завдяки чому було одержано калюсну культуру, здатну до тривалого росту в умовах *in vitro*. Отримані калюси за морфологією можна було розділити на два типи: морфогенний і неморфогенний (рис. 2, в, з). Морфогенний калюс мав ясно-жовтий колір і пухку грубозернисту структуру. Відзначено утворення в ньому морфоструктур — маленьких корінців і лусочок, що не збільшувались істотно в розмірах при культивуванні й не давали початку рослинам-регенерантам. Неморфогенний калюс мав забарвлення від світло-бежевого до темно-жовтого, був щільним, іноді дрібнозернистим і не утворював морфоструктур. Неморфогенний калюс на середовищі 5C01 та обидва типи калюсу на 5C1 виявились нежиттєздатними і загинули у віці близько трьох років. На сьогодні з отриманих культур тканин вирощується (вже понад сім років) тільки морфогенний калюс на середовищі 5C01.

Одержані в ході повторного дослідження результати загалом узгоджуються з попередніми сумарними даними багаторічних дослідів із десятьма вихідними цибулинами *U. victoris* [2], згідно з якими показники прямої регенерації та калюсоутворення для 5C1 становили 2,5 ± 0,5 та 79,7 ± 1,4%, а для 5C01 — 29,0 ± 1,5 та 56,3 ± 1,7%, відповідно. Певна різниця в результатах може бути

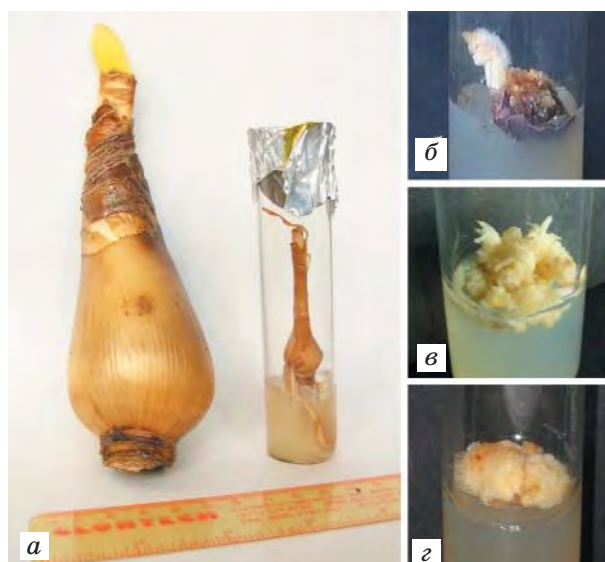


Рис. 2. Цибулина *U. victoris* із природної популяції та мікроцибулінка віком 2,5 року, отримана шляхом прямої регенерації *in vitro* (а); ризогенез (б); морфогенний і неморфогенний калюси *U. victoris*, відповідно (в, з)

зумовлена генетичними відмінностями вихідного матеріалу, про що зазначалось і в попередньому дослідженні. Середовище 5C01 виявилось ефективним для калюсоутворення і прямої регенерації, тоді як 5C1 забезпечувало переважно калюсоутворення.

#### Генетичний аналіз культивованих тканин

Було проведено RAPD-аналіз калюсів через 1, 2 і 3 роки після введення в культуру *in vitro*. Встановлено, що 24 декануклеотидних праймери забезпечували синтез від 4 до 16 чітких відтворюваних фрагментів на праймер розміром 280–2 000 п.н.

Загальна кількість врахованих ампліконів для групи калюсів і материнської рослини становила 262, із яких 8 (3,1%) були поліморфними. Варіабельні амплікони спостерігали у спектрах продуктів шести праймерів. Поліморфізм RAPD-спектрів виявлявся у відмінностях за наявністю (один фрагмент) та інтенсивністю флуоресценції (сім фрагментів) окремих ампліконів. У чотирьох поліморфних фрагментів характер мінливості виявився подібним для всіх культур — зі збільшенням тривалості культивування на обох середовищах відбувалося поступове посилення флуоресценції, яка досягала найбільшого значення у трирічній морфогенній калюсній культурі на середовищі 5C01. Варіабельність решти ампліконів спостерігали лише в окремих варіантах калюсів.

Генетичні відстані Жакарда між рослиною та отриманими від неї калюсами становили 0,39–2,32%. Генетична мінливість була дещо вищою на середовищі 5С1: у середньому для калюсів різного віку та морфотипу із цього середовища генетичні дистанції від рослини досягли 1,47%, тоді як на середовищі 5С01 — 1,16%. Генетичні відстані між рослиною та калюсними культурами однакового типу та віку були вищими в 1,2–2,0 рази за культивування на середовищі 5С1, виняток становив однорічний неморфогенний калюс, генетичні зміни в якому були однаковими в разі культивування на обох середовищах (рис. 3). Достовірність відмінностей між калюсними культурами на різних середовищах за рівнем генетичних змін (порівняно для кожного віку з урахуванням типів калюсу як повторностей) підтверджено методом парного *t*-критерію на 95%-му рівні ймовірності.

На середовищі 5С01 виявлено більш істотні відмінності між калюсами різних типів — генетична відстань між неморфогенним калюсом і материнською рослиною перевищувала відстань для морфогенного калюсу після року культивування в 2 рази, а після двох — у 2,5 рази (рис. 3). На середовищі 5С1 генетичні відстані між рослиною і калюсними культурами після одного року культивування були однакові для обох типів культур, а після двох — відмінності неморфогенного калюсу від рослини перевищували аналогічний показник морфогенного калюсу в 2 рази. Тобто, у процесі культивування накопичення генетичних змін відбувається швидше на середовищі 5С1 та в неморфогенній калюсній культурі. Разом з тим оцінка методом парного *t*-критерію відмінностей між різними типами калюсу за рівнем генетичних змін виявила їх недостовірність на 95%-му рівні ймовірності.

Тенденція, яка простежується для культур незалежно від типу росту та середовища, — накопичення генетичних змін у процесі культивування. Винятком був неморфогенний калюс із середовища 5С1, у якого після 19-го пасажу не спостерігали зростання рівня відмінностей від рослини. У решті випадків у кожній наступній точці аналізу, порівняно з попередньою, генетичні відстані збільшувалися в 1,5–3 рази (рис. 3). Для кожного із середовищ метод парного *t*-критерію показав достовірність відмінностей першого із значень генетичних відстаней між калюсами та рослиною від групи наступних і останнього із значень від групи попередніх з ймовірністю 95%.

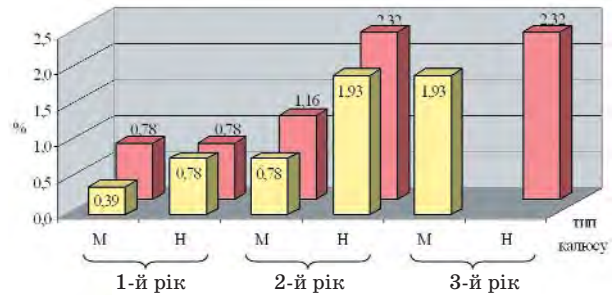


Рис. 3. Рівень генетичних змін на двох живильних середовищах у морфогенного (М) і неморфогенного (Н) типів калюсу.

Генетичні відстані Жакарда між вихідною рослиною та калюсними культурами за результатами RAPD-аналізу: ■ — 5С01, ■ — 5С1

### Аналіз рослин-регенерантів

Досліджено 12 мікроцибулинок та 6 ризогенних культур, які являли собою конгломерат коренів різної морфології. Регенеранти одержали прямою регенерацією на середовищі 5С01. Застосували 14 декануклеотидних праймерів, які в попередніх дослідженнях ДНК культивованих тканин *U. victoris* давали поліморфні спектри продуктів [8]. Загалом було враховано 152 амплікони. Тринадцять регенерантів (72%) не відрізнялись від материнської рослини за спектрами ПЛР-продуктів (рис. 4). У решті виявлено 6 поліморфних фрагментів (9,1%), отриманих із застосуванням 4 праймерів. Чотири із цих фрагментів зникали в одного з регенерантів (рис. 4, доріжка 9), два — мали кількісну мінливість — інтенсивність їх флуоресценції значно зростала у чотирьох інших регенерантів (дані не наведено). Генетичні відстані Жакарда між рослиною та отриманими від неї регенерантами становили 0–2,7% (у середньому — 0,5%), між окремими рослинами у групі регенерантів — 0–4,0% (у середньому — 0,8%).

Проведений генетичний аналіз свідчить про те, що обидва живильних середовища забезпечують низький рівень геномної мінливості *U. victoris* в культурі *in vitro* як за прямої регенерації, так і за калюсогенезу та тривалого (до трьох років) культивування калюсу. Разом з тим було встановлено, що в разі культивування калюсних культур на середовищі 5С1 спостерігається підвищений порівняно з культивуванням на 5С01 рівень мінливості. Це можна пояснити наявністю у складі 5С1 ауксину 2,4-Д, на відміну від 5С01, яке містить НОК. Дані літератури свідчать про більшу мутагенну дію 2,4-Д порівняно з НОК в однакових концентраціях або концентраціях одного порядку [3, 11–13]. Наприклад, культивування сус-

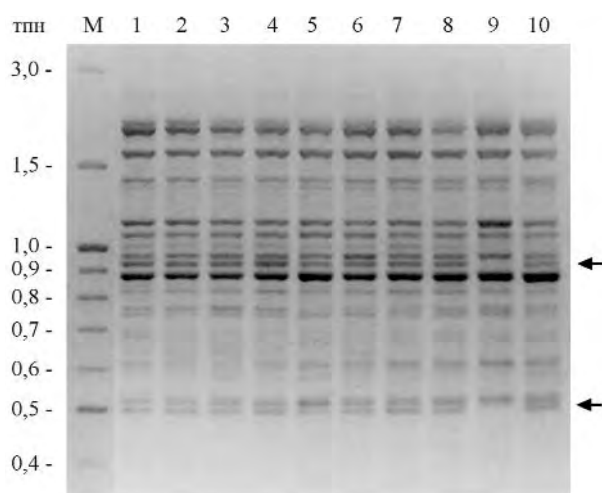


Рис. 4. Генетична стабільність *U. victoris* за прямої регенерації. RAPD-профілі материнської рослини (дор. 1) та регенерантів (дор. 2–10) (праймер А04): М — маркер молекулярної маси. Стрілками позначено поліморфні амплікони

пензійної культури орхідеї *Doritaenopsis* з 1 мг/л 2,4-Д спричинювало значне зменшення частки клітин із вмістом ДНК 4С і збільшення клітин із 8С. Додавання до середовища НОК призводило до подібних, але менш помітних змін структури клітинної популяції лише в концентрації 10 мг/л, проте не в нижчих (1 і 5 мг/л) концентраціях [12]. В *Urginea indica* 2,4-Д (2 та 4 мг/л) і НОК (2 мг/л) відрізнялися за впливом на полісоматичну тканину експланта, зокрема 2,4-Д стимулювала поділ політенних ядер, а НОК — ні [11].

Можливо, в нашому випадку відмінності за мутагенним ефектом між обома середовищами виявилися меншими внаслідок поєднання в середовищі 5С01 удвічі вищої концентрації  $\alpha$ -НОК з удесятеро вищою концентрацією кінетину. Раніше було показано, що збільшення концентрації кінетину з 0,02 до 1 мг/л зумовлює поліплоїдизацію культури тканин *H. gracilis* та підвищення частоти аберацій анафаз [3, розділ 9]. Зі збільшенням концентрації кінетину з 0,1–0,5 мг/л до 1 мг/л в середовищі частота аберацій хромосом у меристемі коренів картоплі підвищувалась [14].

З другого боку, є повідомлення й про антимутагенний ефект кінетину в концент-

рації 0,1–1 мг/л [15]. Тому, можливо, рівень мутагенності середовищ пов'язаний зі співвідношенням ауксину / цитокініни в їхньому складі, оскільки 5С1 відрізняється значно більшим (у 5 разів) співвідношенням. Середовище 5С1 містило 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л кінетину, 5С01 — 2 мг/л  $\alpha$ -НОК і 1 мг/л кінетину, тобто співвідношення ауксину й цитокініну в середовищах було 10:1 та 2:1.

Результати проведеного дослідження дають підстави рекомендувати застосовану методику отримання та культивування *in vitro* тканин унгернії Віктора для використання в біотехнологічній практиці як спосіб збереження генофонду цієї ендемічної лікарської рослини, а в перспективі — для створення альтернативного джерела біологічно активних речовин і забезпечення фармацевтичної промисловості цінною сировиною з метою збереження цілісності природних фітоценозів. Для збереження генофонду *U. victoris* та прискореного розмноження цієї рослини слід віддавати перевагу короткотривалому (до одного року) культивуванню морфогенного типу калюсу на середовищі 5С01, що забезпечує низький рівень генетичної мінливості культивованих тканин. Пролонговане культивування на середовищі 5С1 калюсу неморфогенного типу можна застосовувати для індукції соматоклональних змін з метою отримання матеріалу для клітинної селекції.

Таким чином, комплексне оцінювання ефективності живильних середовищ для культури тканин і мікроклонального розмноження унгернії Віктора показало, що середовище 5С1 придатне переважно для отримання калюсу *U. victoris*, а середовище 5С01 є універсальним і може ефективно використовуватись для одержання як калюсу, так і регенерантів та їх пролонгованого культивування. Встановлено, що обидва середовища забезпечують порівняно низький рівень генетичної мінливості. Загалом результати дослідження свідчать про високу ефективність розроблених методик отримання культивованих тканин та мікроклонального розмноження унгернії Віктора.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Хамидходжаев С. А. Лекарственные растения рода унгерния в Средней Азии. — Ташкент: Фан, 1982. — 148 с.
2. Кунах В. А., Можилевська Л. П., Бублик О. М. та ін. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 57–63.
3. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 724 с.
4. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Раст. ресурсы. — 1979. — Т. 15, Вып. 4. — С. 516–528.

5. 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.
6. Murashige T., Skoog F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
7. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1979. — 416 с.
8. Бублик О. М. Особливості соматоклональної мінливості унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko). Автореф. дис. ... канд. біол. наук.: 03.00.15. / Ін-т клітин. біол. і генет. інженерії НАНУ, 2009. — 21 с.
9. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multi-locus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes.* — 2006. — V. 6, N 2. — P. 569–572.
10. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. — М.: Финансы и статистика, 1982. — 344 с.
11. Jha S., Sen S. Induction of mitosis in polytene nuclei and hormonal effect on nuclear changes during callus initiation in diploid *Urginea indica* Kunth. (*Liliaceae*) // *Genetica.* — 1990. — V. 80, N 1. — P. 9–15.
12. Mishiba K., Okamoto T., Mii M. Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // *Physiol. Plant.* — 2001. — V. 112. — P. 142–148.
13. May R. A., Sink K. C. Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. // *Plant Sci.* — 1995. — V. 108, N 1. — P. 71–84.
14. Мелик-Саркисов О. С., Черезанова Л. В., Овчинникова В. Н. Экзогенные фитогормоны как фактор цитогенетической изменчивости клеток картофеля в культуре *in vitro* // *Сельскохозяй. биол.* — 1994. — № 1. — С. 69–73.
15. Murata M. Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* — 1989. — V. 78, N 4. — P. 521–524.

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro* ТКАНЕЙ *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko**

Е. Н. Бублик, И. О. Андреев,  
Е. В. Спиридонова Л. П. Можилевская,  
В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Две питательные среды, предложенные ранее для культивирования *in vitro* тканей редкого лекарственного растения *Ungernia victoris*, оценены по показателям эффективности прямой регенерации и каллусообразования, а также генетической изменчивости регенерантов, органогенной и неорганогенной культуры ткани в условиях продолжительного культивирования. Установлено, что среда 5C1 пригодна преимущественно для получения каллуса, тогда как среду 5C01 можно эффективно использовать для получения как каллуса, так и регенерантов, а также их пролонгированного культивирования. Обе среды обеспечивают сравнительно низкий уровень генетической изменчивости. Результаты исследования свидетельствуют о высокой эффективности разработанных методик получения культивированных тканей и микроклонального размножения *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko.

**Ключевые слова:** *Ungernia victoris*, микроклональное размножение, культура тканей *in vitro*, соматоклональная изменчивость.

**NUTRIENT MEDIA FOR *in vitro* CULTIVATION OF *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko TISSUES**

О. М. Бублик, И. О. Андреев,  
К. В. Спиридонова, Л. П. Можилевская,  
В. А. Кунах

Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Two nutrient media proposed earlier to cultivate *in vitro* rare medicinal herb *Ungernia victoris* by the indices of direct regeneration and callusogenesis efficiencies, as well as in terms of genetic variability of the regenerants, organogenic and nonorganogenic culture were assessed under long-term culturing. Medium 5C1 was found to be suitable preferentially for callusogenesis, while medium 5C01 could be used for both callusogenesis and plant regeneration as well as for their long-term cultivation. Both media ensure relatively low level of genetic variability. The obtained results give the possibility to suggest the high efficiency of the developed methods for establishment of tissue culture and micropropagation of *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko.

**Key words:** *Ungernia victoris*, micropropagation, tissue culture, somaclonal variation.