

РОЗДІЛ 3

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ГЕНЕТИКА. ЦИТОГЕНЕТИКА І
ГІСТОМОРФОЛОГІЯ**

УДК 582.998.16:57.086.83

**ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* АРНІКИ
ГІРСЬКОЇ (*ARNICA MONTANA* L.)**

**Акімов В.С., Колісник Х.М., Прокоп'як М.З., Грицак Л.Р.,
Дробик Н.М.**

Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка

E-mail: drobyk.n@gmail.com

До цінних лікарських рослин, що інтенсивно використовуються для потреб офіційної і народної медицини, належить арніка гірська (*Arnica montana* L.). З лікувальною метою використовуються квіткові кошики арніки (*Flos arnicae*), кореневища і корені (*Rhizoma et Radix arnicae*), у меншій мірі – листки (*Folium arnicae*) [1, 3]. Відомо, що екстракти *A. montana* є основою лікарських препаратів "Аркален", Просталад», «Кардіолін», «Стоматофіт», «Іов-венум», «Мазь арніки Др. Тайс» та ін. Їхня фармакологічна активність проявляється у кровоспинній, жовчогінній, протисклеротичній, подразнюючій, бактерицидній, сечогінній, потогінній, утеротонізуючій, холекінетичній, протизапальній, ранозагоювальній, беззаспокійливій, судинорозширювальній, тонізуючій, протисудомній, антиоксидантній та заспокійливій діях [1]. Цінні лікарські властивості *A. montana* обумовлені синтезом у ній широкого спектру біологічно активних речовин (БАР). У суцвіттях міститься до 4 % формуючої речовини – арніцину, що складається із суміші 3-х речовин: арнідіолу (арнідендіол), фарадіолу (ізоарнідіол) і крайнього вуглеводу. Із листків і кошиків *A. montana* виділено арніфолін – складний ефір сесквітерпенового оскикетолактону і тиглінової кислоти, каротиноїди, холін, бетаїн, цинарин (тридипсид кофейної і хлорогенової кислот), ефірну олію (0,04-0,07 %). Із квіток виділено також олію, вуглеводи, дві смолисті речовини і барвник

лютеїн. Виявлено органічні кислоти: фумарову, яблучну і молочну як у вільному стані, так і у вигляді кальцієвих і калієвих солей. Аскорбінової кислоти міститься 21 % [1]. Корені арніки містять ненасичені вуглеводи і невелику кількість фітостеринів, ефірну олію, а також органічні кислоти: ізомасляну, мурашину і ангелікову [3].

У зв'язку із зменшенням чисельності популяцій через надмірну експлуатацію сировинних запасів *A. montana*, вид було занесено до Червоної книги України (1996 р.). Надання виду природоохоронного статусу посприяло частковій стабілізації популяцій, і у наступне видання Червоної книги України (2009 р.) він не включений. Однак, *A. montana* і надалі вимагає посиленої уваги і охорони. З метою збільшення сировинних запасів арніки для фармацевтичної промисловості можна створювати промислові плантації. Проте, культивування *A. montana* поза природним ареалом альпійської та субальпійської зон Карпат є неможливим через високу вимогливість рослини до екологічних умов. Інший шлях вирішення цієї проблеми – пошук та заміна *A. montana* на близькоспоріднені за вмістом БАР види. Встановлено, що з усіх видів роду *Arnica* L. лише арніка листяна (*Arnica foliosa* Nutt.) може в найбільшій мірі відповідати цим вимогам [1, 3]. В Україні проведено низку досліджень щодо розробки способів та методів інтродукції арніки листяної. Починаючи з 1980-их років, цей вид введений у культуру і вирощується на території Західного Поділля [1].

Ще одним із шляхів вирішення проблеми забезпечення фармацевтичної промисловості цінною рослинною сировиною *A. montana*, а також збереження генофонду цього виду, є використання сучасних біотехнологічних методів та підходів. Тому, метою роботи було введення *A. montana* в культуру *in vitro*.

Вихідним матеріалом було насіння *A. montana*, зібране з гори Пожижевської (1450 м н.р.м., хребет Черногора, Івано-Франківської області). З літературних джерел відомо, що для успішного проростання насіння *A. montana* потрібна короткотривала холодова стратифікація, обробка гібереловою кислотою (ГК₃) протягом п'яти і більше діб або ж пошкодження покривів. Насіння краще проростає в умовах освітлення [3]. Враховуючи приведені вище дані, був досліджений вплив різних факторів (строків висаджування, дії розчину ГК₃ – 100 і 1000

мг/л, та освітлення) на схожість насіння *A. montana*. При відпрацюванні умов стерилізації насіння оптимальною виявилася обробка протягом 20 хв 15 %-им розчином H_2O_2 . Ефективність стерилізації становила 99,4 %. Аналіз результатів досліджень показав, що насіння краще проростає в умовах освітлення. Холодова стратифікація (+5–7°C) протягом 1,5–2 місяців та передпосівна обробка насіння *A. montana* розчинами ГК₃ протягом однієї доби підвищує його схожість. При цьому більш ефективним для порушення періоду спокою є використання концентрації 1000 мг/л – схожість насіння при цьому була в 1,5–2 рази вищою. Слід зазначити, що здатність до проростання насіння *A. montana* зберігається до трьох років.

Отже, завдяки поєднанню двох факторів, що порушують спокій насіння – холодової стратифікації при температурі +5–7°C протягом 1,5–2 місяців та обробки ГК₃ концентрацією 1000 мг/л протягом однієї доби, нам вдалося підвищити схожість насіння до 45 % і отримати життєздатні проростки *A. montana* на живильному середовищі МС/2 без регуляторів росту. Дослідженнями інших вчених встановлено, що схожість близького до *A. montana* виду роду *Arnica* – *A. foliosa*, в умовах *in vitro*, лежала в межах 16–33 % і підвищувалася лише за умови пророщування насіння на середовищі МС, доповненому БАП і ГК₃ [3]. Встановлено, що більш сприятливим для росту рослин *A. montana in vitro*, порівняно з рідким, було агаризоване середовище, доповнене 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). Відомо, що *A. montana* належить до рослин з прикореневою розеткою листків [14], що ускладнює живцювання рослин в культурі *in vitro*. Для полегшення живцювання у середовище ми додавали ГК₃, яка, як відомо, сприяє видовженню міжвузлів [2, 3]. Використання ГК₃ сприяло підвищенню інтенсивності інтеркалярного росту *A. montana*: протягом 30-ти діб вирощування у середовищі з 0,5 мг/л ГК₃ довжина рослин збільшувалася у 2,7 рази, тоді як у без ГК₃ – лише в 1,9 рази.

Встановлено, що живильні середовища Мурасіге, Скуга (МС) [5] та середовище МС з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2), доповнені 0,1 мг/л 2,4-дихлороцтової кислоти (2,4-Д), забезпечували інтенсивний калюсогенез з листкових і черешкових експлантів *A. montana*. Оптимальним із протестованих як для індукції з різних типів експлантів, так і для проліферації калюсу *A. montana*, було середовище В₅ [5] з половинним вмістом макро- та мікросолей (В₅/2), що містило 4

мг/л НОК і 1 мг/л кінетину (Кін). Згідно з дослідженнями інших авторів, оптимальним не лише для утворення калюсу з коренів, меристематичних верхівок і гіпокотилія *A. montana*, але й для його росту, було середовище МС, доповнене Кін, β -індолилцтовною кислотою (ІОК) та НОК [3]. У деяких випадках на початкових етапах проліферації (1–3 пасажі) культури кореневого і листового походження поряд з наростанням калюсу ми спостерігали спонтанну регенерацію коренів.

У результаті проведених досліджень підібрано оптимальні умови для проростання насіння, вегетативного розмноження і росту, а також індукції калюсоутворення з різних типів експлантатів та тривалого вирощування культури тканин *A. montana* в умовах *in vitro*.

Список літератури:

1. Зеленіна Г.А. Морфогенез в культурі *in vitro* сегментів стебла і клональне мікророзмноження *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* (Nutt.) Maguire: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03. 00. 20 / Українська Академія Аграрних Наук.; Нікітський ботанічний сад–Національний науковий центр. Ялта, 2007. 25 с.
2. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К., 2005.
3. Петріна Р.О., Маснюк Я.Т. Калусогенез у культурі *in vitro* арніки гірської // *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2008. № 608. С. 151-155.
4. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968. Vol.46, №5. P. 417–421.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol.15, №13. P. 473–497.