

БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ

НАУКОВИЙ ВІСНИК
ЧЕРНІВЕЦЬКОГО УНІВЕРСИТЕТУ

БІОЛОГІЯ

Рік заснування 1996

Том 5
Випуск 4

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

Чернівці
Видавництво Чернівецького університету
2013

ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ ВИРОЩУВАННЯ *ARNICA MONTANA L* НА ЗАКАРПАТТІ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

Т. І. ІГНАТКО, Г. М. ДЕНЧИЛЯ-САКАЛЬ, А. В. КОЛЕСНИК,
В. І. НІКОЛАЙЧУК

Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет»,
вул. Волошина, 32, м. Ужгород, Україна
e-mail: ihnatko@mail.ua

Досліджено особливості мікроклонального розмноження *Arnica montana L*, стерилізації рослинного матеріалу, підбір та модифікація живильних середовищ з метою одержання рослин регенерантів.

Мінеральну основу середовища доповнювали вітамінами, регуляторами росту, іншими ор-ганічними добавками. Оптимальною для виду є температура 25-27°C. Освітлення може бути цілодобове або 14 годинне, в нашому випадку найбільш спри-ятливим було 14 годинне, вологість повітря - 70%. При пасажуванні найбільш важливим моментом є вибір материнської рослини і експланту. В якості експлантів використовували листки, стебла та корені отримані з асепти-чно вироцених паростків.

В результаті випробування різних комбіна-цій співвідношень НУК та БАП встановлено, що для *A. montana L* найбільш ефективними були наступні концентрації фітогормонів: БАП – 1,5, 2 мл/л, НУК – 1, 1,5, 2 мл/л. Виявле-но, що розвиток калюсу найінтенсивніше спосте-рігається протягом 3-4 тижнів, після чого спо-стерігався про-цес старіння і відмирання тка-нин.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, калюсогенез, органогенез, вплив фітогормонів.

Вступ. Метод культури клітин, тканин, і ор-ганів нині широко впроваджується в багатьох країнах світу для розв'язання в тому числі про-блем сучасної селекції. Збереження та віднов-лення рослинного різноманіття, а також забезпе-чення фармакологічною продукцією на сьогодні є однією з фундаментальних проблем біології. Колекції рослин, вирощених у штучно створених умовах, здатні не тільки стати банком генетич-них ресурсів, але й забезпечити потреби у лікар-ській сировині, рослинному матеріалі для науко-вих досліджень.

На сьогодні широко використовуваними в бі-ологічних дослідженнях є методи стерильної ку-льтури рослинних клітин, тканин і органів, осно-вою яких є процеси морфогенезу в регульованих умовах *in vitro*.

Арніка гірська – один із рідкісних видів лікар-ських рослин, ареал яких скорочується і тому по-требує охорони [5]. На сьогоднішній день існує потреба у відновленні природного ареалу цього унікального виду і в тому числі забезпечення фа-рмацевтичної промисловості необхідною рос-линною сировиною.

При розробці способу клонального мікророз-множення для рослин кожного виду необхідно визначити стратегію розмноження, вибрати та ввести в культуру *in vitro* первинний експлант,

дібрати умови, які б сприяли реалізації його морфогенетичного потенціалу. Для досягнення високого коефіцієнта розмноження важливим є вивчення процесів, що обмежують виживання рослин-регенерантів в період їх адаптації до природних умов вирощування.

Метою даної роботи було вивчено особливос-ті мікророзмноження *A. montana* в культуру *in vitro*; підбір оптимальних варіантів стерилізації рослинного матеріалу та поживних середовищ; отримання достатньої кількості посадкового ма-теріалу, однорідного за темпами розвитку та вмі-стом фармакологічно активних речовин.

Матеріали та методи. *Arnica montana L.* — рослина родини айстрових (складноцвіті) — *Asteraceae L (Compositae L)*. Багаторічна трав'яниста, залозисто-пухната рослина [1]. Ко-реневище коротке, розташоване на глибині від 1-3 до 60-70 см, іноді на поверхні, коричневе або темно-коричневе, всередині біле [2]. Стебло прямостояче 15—80 см завдовжки [3]. Стеблові листки прості, довгастої форми з хвилястими краями, сидячі, наполовину менші, ніж ті, що зі-брані при корені в розетку. Квітки оранжеві, дво-статеві, верхівкові, поодинокі, зібрані в кошики, мають приємний специфічний запах. Цвіте в че-рвні-липні[4].

Вихідним матеріалом для введення в культуру

було насіння *A. montana L.*, зібране в Карпатському біосферному заповіднику.



Рис.1 Проросле насіння Arnica. montana L.

Підготовка ізолюваних верхівок до посадки на середовище починалося з ізоляції тканин на інтактних рослинах. Меристему вичленяли із зелених проростків в ламінарному боксі. Перед початком роботи робоче місце, інструменти і руки протирали спиртом. Стерилізацію проводили у стерильних хімічних склянках, накриваючи їх чашками Петрі. Очищений і промитий рослинний матеріал у боксі занурювали на 4 хвилини в склянку з розчином хлораміну (1:1), після чого 2-3 рази промивали стерильною дистильованою водою і швидко переносили експланти на живильне середовище Мурасіге-Скуга.

Пасажований матеріал культивували в пробірках з робочим об'ємом середовища 10 мл при температурі 20 ± 23 °C і відносній вологості повітря 70 %, освітлюючи їх додатково люмінесцентними лампами протягом 14 годин. Аналіз результатів проводили на 21 добу культивування.

Результати досліджень та їх обговорення. Живильне середовище – головний фактор, що обумовлює успіх мікроклонального розмноження рослин (МКР) [6]. Мінеральну основу середовища доповнювали вітамінами, регуляторами росту, іншими органічними добавками, зокрема: сахарозою — 30 г/л, мезоінозитом — 100 мл/л, ауксином - НУК (1-нафтилуксусна кислота) — 0,1-2 мл/л, цитокініном - БАП (6-бензиламінопурин) — 0,1-2 мл/л і гібереловою кислотою ГК₃ — 1 мл/л, також середовище містило у своєму складі вітаміни В1 (тіамін), В6 (піридоксин), В5 (нікотинова кислота) — 1 мл/л. В досліді використовували по 25-30 проростків. Основою середовища є мінеральні солі, які містили необхідні для росту рослин макро - (N, P, K, Ca, Mg, S) і мікроелементи (Fe, B, Mn, Zn, Cu,

Насіння висівали на чашки Петрі, для культивування відбирали, проростки довжиною 1-2 см.



Fig.1 sprouted seeds Arnica montana L.

Na, Co, Mo, Cl, Ni) [10].

На ріст і регенерацію ізолюваних тканин *A. montana L.* істотно впливають умови культивування експлантів: температура, освітлення, відносна вологість повітря [7]. Оптимальною для виду є температура 25-27°C. Освітлення може бути цілодобове або 14 годинне, в нашому випадку найбільш сприятливим було 14 годинне, вологість повітря - 70%. При пасажуванні найбільш важливим моментом є вибір материнської рослини і експланту. В якості експлантів використовували листки, стебла та корені отримані з асептично вирощених паростків.

Насінневий матеріал висівали в чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір (23 шт) і пророщували у водній культурі при температурі 20 ± 23 °C. Перші проростки з'явилися вже на 5 добу. Схожість на 10 день експлантів становила 10-11 проростків, тобто 47,8 % від загальної кількості висіяного насіння. Динаміка схожості була наступною: 5 доба – 1-2 насінини, від загальної кількості пророслого насіння, 6 - 3 шт., 7 – 5 шт., 8 – 7 шт., 9 – 9 шт., 10 – 11 шт. (рис.1, 2).

Для індукції калюсної тканини стерильний матеріал в чашках Петрі скальпелем розрізали на частини (10-15 мм) і висаджували, для активації морфогенезу на середовище МС з вмістом агар-агару – 9-10 г/л, маточних розчинів по 10 мл/л та сахарози 30 г/л і додаванням 6-бензиламінопурину (БАП) - 0,1-2 мл/л та нафтилоцтової кислоти (НУК) - 0,1-2 мл/л. Пасажування експлантів здійснювалося тонким довгим пінцетом так, щоб він не торкався країв пробірки. Експланти занурювали в поживне середовище на 1-3 мм до повного контакту з ним.

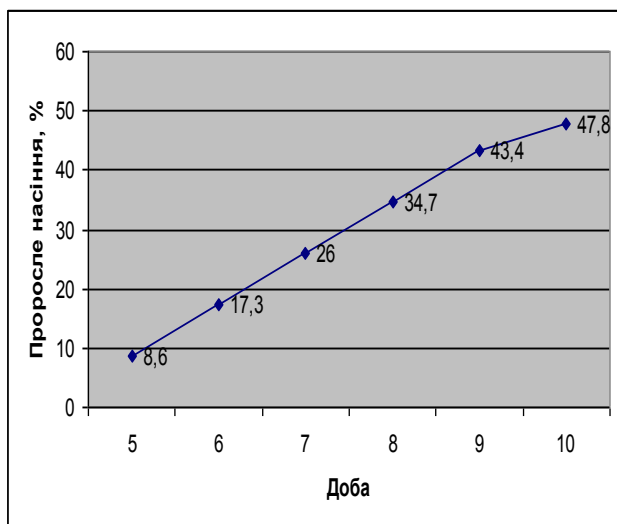


Рис. 2. Динаміка схожості насіння *Arnica montana*
Fig. 2. Dynamics of seed germination *Arnica montana*

Таблиця 1.

Вплив регуляторів росту на морфогенез
Arnica montana

Table 1.

Influence of growth regulators on morphogenesis
Arnica montana

№	НУК	БАП	Вживаність експлантів на 20 день
1	-	-	0
2	1	1	0
3	-	1	13,59±4,51
4	1	-	13,59±4,51
5	0,5	1	13,59±4,51
6	1	0,5	0
7	1	1,5	22,65±4,55
8	1,5	1	31,75±4,55
9	-	1,5	13,59±4,51
10	1,5	-	13,59±4,51
11	0,5	1,5	22,65±4,55
12	1,5	0,5	22,65±4,55
13	1	2	13,59±4,51
14	2	1	22,65±4,55
15	2	2	31,75±4,55
16	1,5	0	13,59±4,51
17	0	1,5	0
18	1,5	0	0
19	0,5	0,5	22,65±4,55
20	1,5	1,5	31,75±4,55

В результаті випробування різних комбінацій співвідношень НУК та БАП встановлено, що для *A. montana L* найбільш ефективними були наступні концентрації фітогормонів: БАП – 1,5, 2 мл/л, НУК – 1, 1,5, 2 мл/л. Виявлено, що розвиток калюсу найінтенсивніше спостерігається протягом 3-4 тижнів, після чого спостерігався процес старіння і відмирання тканин.

При культивуванні на модифікованому середовищі вже на 8-9 добу у експлантів спостерігався активний ріст центрального пагона (близько

1,25±0,5 см), і поява перших справжніх листків 1-2 шт. На 12-14 день стебло було завдовжки 12,5±0,5 см., кількість листків збільшилась до 9-15 шт. Після 2-го тижня культивування нові листки не з'являлися, стебло припиняло свій ріст. Початок калюсоутворення спостерігався вже на 5-7 добу після висаджування (рис.2, 3).



Рис.2 *A. montana* на середовищі Мурасіге-Скуга.
(НУК)

Figure 2 *A. montana* on medium-Murasige Skuha.
(NUS)



Рис.3 *A. montana L*. на середовищі Мурасіге-Скуга.
(БАП)

Figure 3 *A. montana L*. na environment Murasige-Skuha. (BAP)

При мікроклональному розмноженні рослинного матеріалу одним із важливих етапів є ризогенез. На 22 добу спостерігалася масова поява коренів. Упродовж 28-30 доби було одержано понад 90% регенерантів, що мали корені.

Висновки. Встановлено, що для культивування експлантів *Arnica montana L* найбільш сприятливим є 14 годинне освітлення, температура 25-27 °С, вологість повітря - 70%. Найбільший відсоток стерильних експлантів одержано при поверхневій стерилізації розчином хлораміну (1:1) протягом 4 хвилин. При мікророзмноженні даного виду найефективнішими є концентрації фітогормонів: БАП – 1,5, 2 мг/л, НУК – 1, 1,5, 2 мг/л. При культивуванні на такому середовищі через 16-21 добу, спостерігався активний ріст, як центрального пагона, так і формування додаткових адвентивних пагонів.

Список літератури:

1. В.І.Комендар, П.М. Скунець, М.Ю.Гнатюк Зелені перлини Карпат. – Ужгород: Карпати, 1985.- 88с
2. Ивашин Д.С. Семенное и вегетативное возобновление *Arnica montana L.* и *Gentiana lutea L.* в Украинских Карпатах // Ботан. журн. - 1960. - 45, №7-9. - С. 1039-1041.
3. Товстуха Є.С. Фітотерапія. - К.: Здоров'я, 1990.- 304 с.
4. Чопик В.И., Дудченко Л.Г., Краснова А.Н. Дикорастущие полезные растения Украины. - К.: Наук. думка, 1983. - С. 14-15.
5. Машковський М.Д., Лекарственные средства. Т.2. – М., 1987. – С.87.
6. Lumsdem P. Y., Pryce S., Leiferi C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of in vitro cultured plants//Progress in Plant cellular and Molecular Biology /Ed. By H. Nijkamp. – Amsterdam: Kluwer Acad. Publ., 1990. – P. 108-113.
7. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К. : Вид-во "Наук. думка", 2005. – 270 с.

PROBLEMS AND PROSPECTS OF *ARNICA MONTANA L.* GROWING IN TRANSCARPATHIAN REGION WITH MICROCLONAL PROPAGATION USAGE

T.I. IGNATKO, G.M.-DENCHYLYA-SAKAI, A.V. KOLESNIK, V.I. NIKOLAICHUK

State Higher Educational Establishment "Uzhhorod National University"
st. Voloshin, 32, m. Uzhgorod, Ukraine
e-mail: ihnatko@mail.ua

*The features microclonal reproduction *Arnica montana L.*, sterylizitsiyi mother plant ALU, selection and modification of culture media to obtain plants regenerants.*

Mineral medium supplemented with vitamins, growth regulators, and other op-ganic add-kami. The optimum temperature for the species is 25-27 ° C. Lighting can be a clock or 14 hour in-first case in most spry-yatlyvym was 14 hours, humidity - 70%. When pasazhuvanni most important point is the choice of the mother plant and explants. As explants wastes-ly leaves, stems and roots derived from substantially asepty-grown sprouts.

*As a result of various tests to combined-this ratio NUS and BAP found that for *A. montana L* was the most effective concentration following phytohormones: BAP - 1.5, 2 ml / l NUS - 1, 1.5, 2 ml / l. Expressions Leno, that the development of the most intensive callus-rihayetsya observed within 3-4 weeks, after which the ACT-sterihavsvya aging and dying tissues-sues.*

Keywords: microclonal reproduction, kalyusohenez, organogenesis, the impact of phytohormones.

Одержано редколегією 25.03.2013