



Mikrorozmnażanie *Arnica montana* L. i wytwarzanie laktonów seskwiterpenowych w uzyskanych roślinach

Izabela Weremczuk-Jeżyna, Halina Wysokińska
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna, Łódź

Micropropagation of *Arnica montana* L. and sesquiterpene lactones in regenerated plants

Summary

Plants of *Arnica montana* L. were micropropagated from shoot tips. Shoot proliferation was obtained on Murashige and Skoog (MS) medium containing auxin (IAA 0.5 $\mu\text{M/l}$) and cytokinin (BAP, Z, TDZ). BAP (0.25 $\mu\text{M/l}$) and Z (0.5 $\mu\text{M/l}$) were most effective for proliferation and elongation of shoots. Under these conditions, about 6 shoots per explant were obtained. Shoot proliferation was also achieved in the presence of TDZ (0.05 $\mu\text{M/l}$). However, when used in higher concentration (0.2-10 $\mu\text{M/l}$), thidiazuron caused shoot vitrification. Rooting of shoots was induced on MS medium without growth regulators. The plantlets were transplanted into pots. Phytochemical analysis showed that 4-week-old plantlets produced sesquiterpene lactones.

Key words:

Arnica montana, micropropagation, sesquiterpene lactones.

Adres do korespondencji

Izabela Weremczuk-Jeżyna,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

1. Wstęp

Arnica montana L. (Asteraceae) jest rośliną leczniczą. Surowiec farmakopealny stanowią koszyczki arniki (*Arniceae Anthodium*), stosowane w medycynie, głównie zewnętrznie, jako środek przeciwpalny, antyseptyczny, przeciwrumatyczny i przyśpie-

szający gojenie ran. Ponadto ekstrakty z arniki stosowane są w kosmetyce (1). *A. montana* w Polsce rośnie rzadko (Sudety, Karpaty, Suwalszczyzna, Puszcza Białowieska) i objęta jest ścisłą ochroną. Ze względu na właściwości lecznicze arniki i trudności w uzyskiwaniu surowca, podjęto badania nad mikrorozmnażaniem tej rośliny z pączków szczytowych. Sprawdzone wpływ różnych cytokinin na proliferację pędów *A. montana*. Otrzymane *in vitro* rośliny badano fitochemicznie pod względem obecności laktonów seskwiterpenowych. Uważa się, że związki te są odpowiedzialne za działanie lecznicze surowców z *A. montana* (2).

2. Materiał i metody

2.1. Mnożenie i ukorzenianie pędów

Materiał wyjściowy do badań stanowiły nasiona *A. montana* otrzymane z Ogrodu Botanicznego w Gottingen. Nasiona sterylizowano w 2% roztworze podchlorynu sodu przez 10 min, następnie płukano je trzykrotnie (po 15 min) w sterylnej wodzie destylowanej i przenoszono na podłoże Murashige i Skoog (MS) (3) z kinetyną 0,1 $\mu\text{M/l}$ i kwasem giberelinowym w ilości 5,0 $\mu\text{M/l}$. Probówki z nasionami trzymano w ciemności, a po ich wykiełkowaniu przenoszono na światło o natężeniu ok. 2500 lux. Po trzech tygodniach hodowli uzyskano siewki, z których pobierano części wierzchołkowe (ok. 0,5 cm), obejmujące pączek szczytowy z dwoma listkami. Eksplantaty umieszczano na agarowym podłożu MS z dodatkiem IAA 0,5 $\mu\text{M/l}$ i BAP 5 $\mu\text{M/l}$. W ciągu czterech tygodni hodowli powstała rozетка licznych krótkich pędów (ok. 0,3 cm długości), przenoszono je na pożywkę MS bez regulatorów wzrostu, w celu ich wydłużenia. W tych warunkach, po dwóch tygodniach pędy osiągały długość 0,5-0,7 cm. Pędy te rozdzielano i umieszczano pojedynczo na podłożu MS zawierającym IAA 0,5 $\mu\text{M/l}$ i jedną z trzech cytokinin: BAP – benzyloaminopurynę, Z – zeatynę, TDZ – tidiazuron. Stężenia cytokinin podano w tabeli 1. Badania powtarzano trzykrotnie. Dla każdej kombinacji cytokininy i auksyny wykorzystano 30 eksplantatów. Otrzymane pędy przenoszono na pożywkę MS bez regulatorów wzrostu w celu ukorzenienia. Kultury prowadzono w fitotronie, w temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, wilgotności 80-90%, przy ciągłym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi o natężeniu ok. 2500 lux. Uzyskane rośliny przenoszono do doniczek ze sterylną ziemią i hodowano przez sześć miesięcy w fitotronie.

2.2. Badania fitochemiczne

Wysuszony i sproszkowany materiał roślinny (części nadziemne 4-tygodniowych, wyhodowanych *in vitro* roślin) (30 g) ekstrahowano chloroformem (300 ml).

Ekstrakt chloroformowy rozdzielano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelazem krzemionkowym. Jako eluent stosowano mieszaninę toluenu i octanu etylu (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 v/v). Otrzymane frakcje badano metodą TLC i rozdzielano na preparatywnej HPLC (Gold firma Beckam; detekcja przy długości $\lambda=225$ nm; rozdział prowadzono na kolumnie ODS; fazę ruchomą stanowiła mieszanina MeOH : H₂O (1:1 v/v); szybkość przepływu wynosiła 1 cm³/min). Identyfikację uzyskanych związków przeprowadzono za pomocą analizy spektralnej (¹H-NMR).

3. Wyniki i dyskusja

W tabeli przedstawiono wpływ różnych cytokinin na proliferację pędów *A. montana*. Najlepszą cytokininą jest BAP użyta w ilości 0,25 μ M/l lub Z w stężeniu 0,5 μ M/l. Na pożywkach zawierających te cytokininy uzyskano ok. 6 pędów z jednego eksplantatu, w ciągu czterech tygodni hodowli. W optymalnych stężeniach te cytokininy (BAP, Z) były również korzystne dla elongacji i morfologii namnożonych pędów; pędy były długie (do 1,5 cm) z normalnie wykształconymi zielonymi liśćmi. Także Conchou i wsp. (4) stwierdzili, że BAP jest cytokininą odpowiednią dla namnażania pędów *A. montana*. Z ich pracy wynika, że optymalne stężenie BAP wynosiło 1 mg/l (5 μ M/l). Przy tym stężeniu uzyskali oni 7,7 pędów z jednego eksplantatu, po sześciu tygodniach hodowli. Jednak w dalszych pasażach liczba otrzymanych pędów zmniejszyła się do około 2 na eksplantat (4). W naszych badaniach BAP użyta w stężeniu wyższym od 0,25 μ M/l (0,5 do 25 μ M/l) hamowała zarówno proliferację jak i wydłużanie pędów oraz powodowała zmiany fenotypowe (chloroza liści). Zeatyna może być użyta dla mnożenia pędów *A. montana* w szerszym zakresie stężeń (2,0-25 μ M/l) niż BAP. W najniższym zastosowanym stężeniu (0,25 μ M/l) zeatyna hamowała wprawdzie proliferację pędów, ale nie zmieniała ich długości i morfologii (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ cytokinin na mnożenie pędów *A. montana* L.

Rodzaj i stężenie cytokininy (μ M/l)	Średnia liczba pędów na eksplantat	Średnia długość pędów (cm)	(%) pędów o zmienionej morfologii*
1	2	3	4
BAP			–
0,25	6,5	1,5	9,0
0,5	3,6	0,6	41,7
2,0	1,5	0,8	52,9
5,0	1,6	0,7	–
10,0	1,1	0,5	–
25,0	–	–	–

1	2	3	4
Zeatylna (Z)			
0,25	2,2	1,1	–
0,5	5,8	1,1	–
2,0	4,9	0,9	2,7
5,0	4,4	0,8	–
10,0	4,9	0,9	–
25,0	3,8	0,9	–
TDZ			
0,025	1,6	1,6	3,3
0,05	5,6	0,8	2,7
0,2	3,8	0,6	18,2
0,5	3,0	0,7	76,0
5,0	2,3	0,8	20,6
10,0	2,8	0,8	26,2

*chloroza, szklistość

Hodowlę prowadzono na podłożu MS z auksyną (IAA 0,5 μ M/l).

Zbadaliśmy również wpływ TDZ na mnożenie pędów *A. montana*. Związek ten jest pochodną mocznika. Jest on stosowany głównie w mikropropagacji drzew liściastych (5), chociaż niektórzy badacze wykorzystują TDZ także dla namnażania pędów u roślin zielnych (6). W przypadku *A. montana* najlepsze wyniki uzyskano stosując TDZ w stężeniu 0,05 μ M/l. W tych warunkach otrzymano średnio 5,6 pędów z jednego eksplantatu; tylko 3% pędów wykazywało zmienioną morfologię (szklistość). Średnia długość uzyskanych pędów wynosiła 0,8 cm. Dłuższe pędy (ok. 1,5 cm) otrzymano po obniżeniu stężenia TDZ do 0,025 μ M/l. Stężenie to było jednak nieodpowiednie dla proliferacji pędów (tab. 1). Również TDZ w wyższych stężeniach (0,2-10 μ M/l) hamował namnażanie pędów i był niekorzystny dla ich elongacji i morfologii; np. przy stężeniu 0,5 μ M/l TDZ, 76% pędów wykazywało objawy szklistości. Uzyskane pędy arniki ukorzeniały się (100%) na podłożu MS bez regulatorów wzrostu, w ciągu czterech tygodni hodowli. Wszystkie roślinki rosły dalej w glebie.

Wyhodowane *in vitro* 4-tygodniowe rośliny badano na obecność laktonów seskwiterpenowych. W częściach nadziemnych tych roślin wykryto helenalinę, hydrohelenalinę i acetylohelenalinę. Identyfikacja dalszych związków jest w toku. Uzyskane wyniki świadczą, że w naszej pracy wyhodowane *in vitro* rośliny nie różnią się składem laktonów seskwiterpenowych od roślin otrzymanych metodą konwencjonalną (7).

Literatura

1. Ożarowski A., Jaroniewski W., (1987), *Rosliny lecznicze*, IWZZ, Warszawa, 86-88.
2. Merfort I., Pietta P. G., Mauri P. L., Zin L., Catalano G., Willuhn G., (1997), *Phytochemical Analysis*, 8, 5-7.
3. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 484-497.
4. Conchou O., Nichterlein K., Vomel A., (1992), *Planta Med.*, 58, 73-76.
5. Hutteman C. A., McGlew S. P., Hachett G., (1996), *Plant Cell, Tiss. Org. Cul.*, 44, 195-204.
6. Hutchinson M. J., Kristinawaj S., Saxena P. K., (1996), *Int. J. Plant Sci.*, 157, 440-443.
7. Willuhn G., Röttger P. M., Matthiesen H., (1983), *Planta Med.*, 49, 226-231.

Badania finansowane z funduszu badań własnych Akademii Medycznej w Łodzi (numer funduszu 502-13-600).