

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БОТАНИКИ И ЛАНДШАФТНОЙ АРХИТЕКТУРЫ

**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ**

Материалы I Международной научной конференции
(21–22 мая 2013 г., г. Новосибирск)

Новосибирск 2013

УДК 633.88
ББК 53.52
Л 43

Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Международной научной конференции (21–22 мая 2013 г., г. Новосибирск) / Новосиб. гос. аграр. ун-т. — Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. — 537 с.

Редакционная коллегия: д-р с.-х. наук, проф. *С. Х. Вышегуров*
канд. биол. наук, доц. *И. И. Баяндина*
канд. биол. наук, *Ю. В. Загурская*
канд. биол. наук, доц. *Е. В. Дымина*

В сборник включены статьи участников I Международной научной конференции «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы», проведенной кафедрой ботаники и ландшафтной архитектуры Новосибирского государственного аграрного университета. В сборник вошли статьи по следующим основным направлениям:

1. Биология лекарственных растений.
2. Биологически активные вещества растений.
3. Интродукция и выращивание лекарственных растений.
4. Фармакология. Фармакогнозия.
5. Использование лекарственных растений в ландшафтном дизайне.
6. Фитотерапия.

Материалы представляют интерес для широкого круга специалистов учебных и научных учреждений в области ботаники, физиологии и биохимии растений, фитохимии, интродукции растений, фармакогнозии, фармакологии, экологии, лесного дела, ландшафтной архитектуры и ландшафтного дизайна.

Состав научного комитета:

председатель: *С. Х. Вышегуров*, д-р с.-х. наук, проф., Новосибирск, Россия
И. Ю. Коропачинский, акад. РАН, Новосибирск, Россия
Р. А. Музычкина, д-р хим. наук, проф., Алматы, Казахстан
А. Н. Куприянов, д-р биол. наук, проф., Кемерово, Россия
М. Б. Плотников, д-р биол. наук, проф., Томск, Россия
Э. Э. Шульц, д-р хим. наук, проф., Новосибирск, Россия
Mammadov Ramazan, Dr., Prof., Денизли, Турция

Состав организационного комитета:

председатель: *С. Х. Вышегуров*, д-р с.-х. наук, проф., Новосибирск
И. И. Баяндина, канд. биол. наук, Новосибирск
Е. В. Дымина, канд. биол. наук, Новосибирск
Н. В. Пономаренко, канд. с. наук, Новосибирск
Ю. В. Загурская, канд. биол. наук, Кемерово

ISBN 978-5-94477-130-8

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И КАЛЛУСОГЕНЕЗА КРАСНО- И БЕЛОЦВЕТКОВОЙ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

Копач О. В., Кузовкова А. А., Решетников В. Н.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь,
e-mail: olga-kopa@mail.ru

Выявлены физиолого-биохимические особенности введения в культуру *in vitro* и каллусогенеза расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас. Показаны различия в содержании белка и состоянии антиоксидантной системы (по активности пероксидаз гваяколового типа и супероксиддисмутаза) в эксплантах (корень и семядольный лист) двух рас и иницированных из них каллусах.

Ключевые слова: расторопша пятнистая, *Silybum marianum* L., каллус, пероксидаза гваяколового типа, содержание белка.

Лекарственные растения являются природными источниками биологически активных веществ (БАВ). Сегодня в медицине, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности активно используется более 300 видов растений, из которых около 60 — специально выращиваются, а остальные — дикорастущие. Решить проблему дефицита сырья и сохранить в природе лекарственные растения могут клеточные технологии. Культуры клеток, тканей, органов и микрорастения *in vitro* можно использовать как «фабрики» по производству БАВ [1]. Однако широкое их использование часто лимитировано рядом факторов, один из которых — недостаток знаний о физиологии и биохимии клеточных культур конкретных лекарственных растений. Известно, что клетки каллусных культур испытывают окислительный стресс уже на этапе вычленения экспланта и далее в процессе культивирования уровень стресса возрастает вследствие специфических условий *in vitro*. Сильное развитие окислительного стресса приводит к клеточным повреждениям и гибели культуры. Активные формы кислорода — прооксиданты — утилизируются специализированными неферментными и ферментными антиоксидантными системами [2]. Способность клеток поддерживать баланс между образованием прооксидантов и их дезактивация зависят от генотипа растения. Поэтому цель наших исследований состояла в выявлении физиологических особенностей и сравнительном анализе состояния ферментной антиоксидантной системы (по активности пероксидаз гваяколового типа (ПГТ) и супероксиддисмутаза (СОД)) лекарственного растения расторопши пятнистой двух рас — красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца венгерской селекции — при введении в культуру *in vitro* и каллусогенезе. Оценка состояния антиоксидантной системы *S. marianum* исследуемых сортов актуальна также и с позиции их общей биохимической характеристики, поскольку ранее было показано [3], что семена сортов расторопши пятнистой, относящихся к разным расам, отличаются по накоплению БАВ, особенно флавонолигнанов (т.н. силимариновый комплекс), обладающих антиокислительной и антирадикальной активностями [4].

Для наших исследований семена *S. marianum* сорта Золушка были представлены лабораторией биоразнообразия растительных ресурсов ЦБС НАН Беларуси, а сортообразца венгерской селекции — доктором Abel Laszlio-Bencsik-Budakalasz (Венгрия). При введении в культуру *in vitro* всхожесть семян *S. marianum* сорта Золушка составила 51,7%, их инфицированность — 8,3%, для сортообразца — соответственно 83,5 и 1,2%. К 7-му дню культивирования у обоих вариантов одновременно с появлением корней начиналось развитие семядольных листьев, к 17-му дню была сформирована одна пара настоящих листьев, вторые находились на начальном этапе развития. Однако размер семядольных листьев у белоцветковых растений превышал таковой красноцветковых, а 17-дневные растения венгерской селекции отличались от сорта Золушка и по ряду биохимических показателей. Обнаружены различия в содержании белка и в активности главных антиоксидантных ферментов в корнях, стеблях, семядольных и настоящих листьях (табл. 1). Повышенное содержание белка в семядольных листьях *S. marianum* белоцветковой расы, по-видимому, и явилось одной из причин их лучшего развития.

Инициация каллусогенеза на корневых и семядольно-листовых эксплантах, взятых с 17-дневных растений красно- и белоцветковой *S. marianum*, также наступала в разные сроки. Очаги каллусных клеток на эксплантах венгерского сортообразца появились на 11-й день культивирования, а у сорта Золушка — лишь на 19-й. К 18-му дню у 100% корневых и семядольно-листовых эксплантов белоцветковой расторопши был полностью сформирован краевой каллус, в то время как у красноцветковой эта стадия каллусогенеза наблюдалась на 29-й день культивирования. Вероятно, экспланты от

белоцветковых растений венгерской селекции обладали гормональным статусом, способствующим более активному каллусогенезу. Определенную роль, возможно, в этом сыграла и высокая активность СОД — фермента, утилизирующего свободные радикалы. Роль ПГТ в инициации каллусогенеза у расторопши пятнистой неоднозначна, поскольку не наблюдалось единообразия в поведении ПГТ в корнях и семядольных листьях красно- и белоцветковых растений (см. табл. 1).

Биохимический анализ первичных каллусов (нулевой пассаж — 34 дня культивирования на среде для каллусогенеза для сорта Золушка и 25 дней — для венгерского сортообразца) показал, что инициация каллусогенеза сопровождается индукцией синтеза белка в растительных клетках.

Таблица 1

Биохимическая характеристика 17-дневных *in vitro* растений *S. marianum* красно- и белоцветковой рас

Показатель	Корень	Стебель	Лист	Семядольный лист
	Красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции			
Содержание белка, мг/мл	2,113±0,064	0,599±0,044	1,5±0,037	0,764±0,046
Активность ПГТ, у.е./мг белка	17984,126±2020,23	5550,479±532,1	71,378±7,077	1125,654±75,071
Активность СОД, у.е./мг белка	54,790±5,058	90,471±1,213	259,737±6,19	133,78±4,279
Белоцветковый сортообразец венгерской селекции				
Содержание белка, мг/мл	1,764±0,095	0,651±0,082	0,938±0,042	1,07±0,086
Активность ПГТ, у.е./мг белка	2946,334±529,490	1597,649±183,047	1131,802±122,889	1536,571±131,412
Активность СОД, у.е./мг белка	702,773±63,69	276,084±7,502	253,962±25,66	392,396±69,39

При этом в первичных корневых каллусах и от белоцветковой, и особенно от красноцветковой расторопши пятнистой (табл. 1,2) резко снижалась активность ПГТ (соответственно в 7 и 373 раза) по сравнению с таковой в корнях растений. Активность СОД у каллусов также была снижена (соответственно в 60 и 2 раза). В первичных семядольно-листных каллусах на фоне многократного увеличения содержания белка также наблюдалось падение активности ПГТ: незначительное, в 2 раза, в каллусах от сорта Золушка и экстремальное, в 384 раза, от сортообразца по сравнению с исходным эксплантом. При этом активность СОД в каллусе от белоцветковой расторопши была в 43 раза ниже таковой в семядольных листьях, а в каллусе от красноцветковых растений не тестировалась вовсе.

После пассирования на свежую среду (1-й пассаж) и культивирования в течение 17 дней каллусы от *S. marianum* венгерской селекции приобрели более рыхлую структуру и светло-кремовый цвет в отличие от плотных коричневых каллусов (особенно корневых) от белорусских растений. Данные морфологические особенности каллусов сохранялись и в течение 4 следующих пассажей на свежую среду.

Таблица 2

Активность ПГТ (в у.е/мг белка) в каллусах *S. marianum* красно- и белоцветковой рас

Каллус	Пассажи			
	0	1	2	5
Красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции				
Корневой	48,25±3,87	68,85±5,41	16,01±1,39	2,377±0,275
Семядольно-лиственной	695,677±46,076	182,564±25,124	13,684±1,769	8,122±0,569
Белоцветковый сортообразец венгерской селекции				
Корневой	435,93±26,13	–	–	10,18±0,355
Семядольно-лиственной	3,349±0,189	2,149±0,092	13,684±0,897	4,264±0,067

Содержание белка в корневых каллусах от растений обеих рас в течение 2 пассажей сохранялось на уровне первичного каллуса, но к 5-му пассажи увеличивалось на 18 % у каллусов от красноцветковой и на 50 % — от белоцветковой расы. Четкая тенденция к увеличению содержания белка прослеживалась от пассажа к пассажи и у семядольно-лиственного каллуса от белорусской расторопши (на 88 % от 1-го к 5-му пассажи). При каллусогенезе на семядольных листьях венгерского сортообразца подобной картины не наблюдалось. Следует отметить, что в целом в корневых каллусах от красноцветковых растений содержание белка было большим, чем от белоцветковых. Содержание белка в семядольно-листных каллусах от обеих рас было сходным, за исключением каллусов 5-го пассажа.

Активность ПГТ в корневых каллусах резко уменьшалась от нулевого к 5-му пассажи как у красно-, так и у белоцветковой рас (см. табл. 2). Причем активность ферментов в 1-м и 2-м пассажах корневых каллусов от сортообразца была настолько низкой, что не тестировалась используемым методом. Похожая тенденция к резкому снижению активности ПГТ при каллусогенезе была отмечена и для семядольно-лиственного каллуса от красноцветковых растений (см. табл. 2). В семядольно-листных

каллусах от белоцветковой расторопши активность ПГТ экстремально упала в момент инициации каллусообразования и сохранялась на низком уровне от пассажа к пассажи. Что касается изменения в поведении СОД на ранних стадиях каллусогенеза расторопши пятнистой (1–5-й пассаж), то четких закономерностей выявить не удалось.

Таким образом, нами показано, что исследуемые представители красно- и белоцветковой рас расторопши пятнистой отличаются по содержанию белка и активности ПГТ и СОД в отдельных органах (настоящих и семядольных листьях, корнях). Повышенное содержание белка в семядольных листьях белоцветкового сортообразца венгерской селекции, по-видимому, явилось одной из причин их лучшего развития к 17-му дню культивирования в условиях *in vitro* по сравнению с красноцветковым сортом Золушка белорусской селекции. Инициация каллусообразования на корневых и семядольно-листных эксплантах белоцветковой *S. marianum* наступала раньше, чем на эксплантах красноцветковой, что позволяет предположить наличие особого гормонального статуса у сортообразца венгерской селекции. Определенную роль в ускоренной инициации каллусогенеза у белоцветковой расторопши сыграла, по-видимому, и высокая активность СОД, утилизирующей свободные радикалы, которые образуются в клетках, начиная с этапа вычленения экспланта. Каллусы расторопши пятнистой белоцветковой расы в течение 1–5-го пассажей обладали более рыхлой структурой и светло-кремовым цветом в отличие от плотных коричневых каллусов (особенно корневых), полученных от красноцветковой *S. marianum*. Инициация каллусообразования расторопши пятнистой сопровождалась значительным увеличением (от 2 до 5 раз) содержания белка и резким падением активности антиоксидантных ферментов ПГТ (от 2 до 384 раз) и СОД (от 2 до полного отсутствия активности) в клетках первичного каллуса по сравнению с эксплантами. Тканеспецифичность исходных эксплантов (корня и семядольного листа) не определяла изменения в содержании белка и активности СОД в каллусах расторопши пятнистой в процессе дедифференцирования их клеток, но имел значение генотип растений. Поведение ПГТ при каллусогенезе (резкое снижение активности) было универсальным, не зависящим ни от тканеспецифичности исходных эксплантов, ни от генотипа расторопши пятнистой.

Литература

1. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // Journal of Medicinal Plants Research. 2009, Vol. 3, № 13. P. 1222–1239.
2. Faltin Z., Holland D., Velcheva V., Tzapovetsky M. et al. Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for *in vitro* plant differentiation // Plant cell physiol. 2010. Vol. 51, № 7. P. 1151–1162.
3. Кисличенко В. С., Поспелов С. В., Самородов В. Н. и др. Расторопша пятнистая — от интродукции к использованию. Полтава: Полтавський літератор, 2008. 288 с.
4. Campos R., Garrido A., Guerra R., Valenzuela A. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver // Planta Med. 1989. Vol. 55, № 5. P. 417–419.

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОРОСТКОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Корлэтяну Л. Б., Маслоброд С. Н., Ганя А. И., Гушкан И. В., Грати М. И., Клец Ф. И.

Институт генетики и физиологии растений Академии наук Молдовы, Кишинев, Молдова,
e-mail: lcorlateanu@yahoo.com

При действии миллиметрового излучения с длиной волны 5,6 мм, плотностью мощности 6,6–10,0 мВт/см² и экспозициями 2, 8 и 30 мин на семена клещевины, эхинацеи и дурмана из коллекции генетического банка обнаружено существенное ускорение ростовых процессов по параметрам энергии прорастания и всхожести семян, содержания фермента о-ИУК и суммы легкорастворимых белков в корешках проростков, а также снижение числа хромосомных aberrаций в меристеме зародышевых корешков. Метод облучения семян миллиметровым излучением при консервации *ex situ* может быть рекомендован для повышения их жизнеспособности.