

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ *SANGUISORBA OFFICINALIS* L. ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Ковзунова О. В.¹, Черчес М. В.²

¹РУП «Центральный научно-исследовательский институт комплексного использования водных ресурсов», Минск, Беларусь, olga@kovzunova.by

²Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Резюме. Разработана схема введения в культуру *in vitro* *Sanguisorba officinalis* L. Установлено, что наилучшим способом стерилизации является промывание в хозяйственном мыле и замачивание в 0,2 % растворе контактного фунгицида «Дитан» в течение 10 минут и 5 % растворе гипохлорита кальция в течение 10 минут. Показаны изменения основных антиоксидантных ферментов (ПГТ и СОД) кровохлебки при переходе к гетеротрофному типу питания.

THE STATE OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF *SANGUISORBA OFFICINALIS* L. WHEN INTRODUCED INTO *IN VITRO* CULTURE

Kovzunova O. V., Cherches M. V.

Summary. A scheme for introducing *Sanguisorba officinalis* L into in vitro culture has been developed. It has been established that the best method of sterilization is washing in laundry soap and soaking in a 0.2 % solution of «Ditan» contact fungicide for 10 minutes and 5 % calcium hypochlorite solution for 10 minutes. Changes in the main antioxidant enzymes (peroxidase and superoxide dismutase) of burnet are shown during the transition to a heterotrophic type of nutrition.

В настоящее время проблемы регуляции оксидативного стресса и поиск биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, находятся в центре внимания исследователей. Возникновение и развитие многих воспалительных заболеваний сопровождаются свободно-радикальными реакциями перекисного окисления липидов, денатурацией белков и нуклеиновых кислот. В норме скорость свободнорадикальных реакций относительно мала, что обусловлено сбалансированной работой системы антиоксидантной защиты организма. При ее ослаблении возрастает продукция радикалов инициаторов, способствующих повреждению мембран клеток, развитию различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, злокачественных образований. В условиях недостаточной активности эндогенной антиоксидантной системы человека одним из наиболее эффективных способов защиты клеток от повреждающего действия окислителей является введение либо экзогенных антиоксидантных средств, либо лекарственных средств, способных активировать эндогенные антиоксидантные механизмы [1]. В следствие ограниченности сырьевой базы и возрастающим спросом, перспективным является использование современных биотехнологических методов культуру клеток и тканей *in vitro*, позволяющих получать биологически активные вещества лекарственных растений круглогодично.

Перспективным лекарственным растением является кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.). Исследования *in vivo* и *in vitro* растения *Sanguisorba officinalis* L. показали, что растение проявляет широкий спектр фармакологических свойств: антиоксидантной, противовоспалительной, противовирусной, противогрибковой, гемостатической и противораковой активностью. Экспериментальные исследования вытяжек кровохлебки показали, что при местном применении они обладают противовоспалительными и сосудорасширяющими свойствами. Экстракты *Sanguisorba officinalis* L., благодаря наличию тритерпеноидных сапонинов оказывают выраженное противоопухолевое воздействие [2]. Кровохлебка лекарственная входит в Государственную фармакопею РБ и в государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. В связи с вышеизложенным актуальность изучения данной культуры в рамках биотехнологии не вызывает сомнений.

Цель работы – изучить состояние антиоксидантной системы *Sanguisorba officinalis* при переходе к условиям *in vitro* культивирования. В работе использовали классические биотехнологические

методы. Содержание белка определяли по методу Лоури а активность ферментов колориметрическим методом.

На первом этапе исследования осуществлялся подбор стерилизующих агентов для введения в культуру кровохлебки лекарственной с целью получения стерильных *in vitro* растений. Для этого оценивали влияние различных комбинаций стерилизующих веществ на стерильность семян и их жизнеспособность по критерию всхожести. Стерилизацию семян осуществляли промыванием в хозяйственном мыле и замачиванием в следующих стерилизующих реагентах: 1) в 0,2 % растворе контактного фунгицида «Дитан» в течение 10 минут и 5 % растворе гипохлорита кальция в течение 10 минут; 2) в 0,1 % растворе нитрата серебра в течение 15 минут; 3) в 0,1 % растворе Диацида в течение 15 минут; 4) в 7 % растворе гипохлорита кальция в течение 15 минут. После выдерживания семян в стерилизующих веществах проводили их трехкратное промывание автоклавированной водой.

Наибольший процент жизнеспособных и стерильных семян был получен при использовании хозяйственного мыла, «Дитана» и 5 %-ного раствора гипохлорита кальция (рисунок 1).

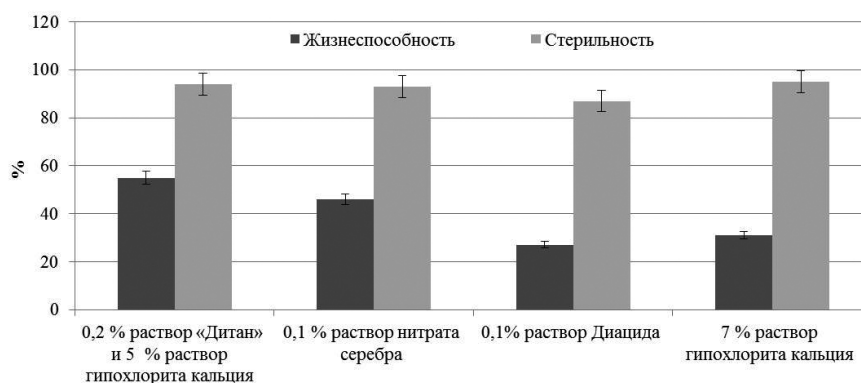


Рис. 1. Жизнеспособность и стерильность семян *S. officinalis* в зависимости от стерилизующего агента

При данном способе стерилизации жизнеспособность семян кровохлебки составила 55 %, их стерильность – 94 %. При использовании в качестве стерилизующего агента 7 %-ного раствора гипохлорита кальция отмечен наиболее высокий выход стерильных семян (95 %) по сравнению с другими реагентами, однако жизнеспособность была низкая: 31 %. Количество жизнеспособных семян при стерилизации в 0,1 %-ном растворе «Диацид» составило 27 %, а количество стерильных семян 87 %. При использовании 0,1 %-ного раствора нитрата серебра количество стерильных семян составило 93 %, а их жизнеспособность 46 %.

Далее семена проращивали на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скута (далее – МС) на свету с фотопериодом 16 ч день / 8 ч ночь при температуре 25°C для получения стерильных *in vitro* растений, необходимых для последующих биохимических анализов. В возрасте 15–20-ти дней сеянцы отделяли и пересаживали на свежую среду МС для наращивания биомассы. Приблизительно каждые 3–4 недели растения *in vitro* пересаживали на свежую среду МС. Культивирование проводили на свету с фотопериодом 16 ч день / 8 ч ночь при температуре 25° С.

Атрибутом нормальной аэробной жизни является генерация активных форм кислорода – прооксидантов. Функционирование и развитие клеток не может быть возможным без существования защитных систем, к которым относятся специализированные ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Образование прооксидантов уравновешенно их дезактивацией антиоксидантами. Отсутствие или сбой в работе антиоксидантов приводит к развитию окислительного стресса, возникновению и накоплению окислительных повреждений. Под системой антиоксидантной защиты подразумевают не только системы, избавляющие организм от активных форм кислорода и предотвращающие их возникновение, но также системы детоксикации, которые устраняют соединения, поврежденные вследствие спонтанного окисления кислородом [3]. К ним относят вещества, способные нейтрализовать свободные радикалы и уменьшать интенсивность

свободнорадикального окисления, а также те, которые оказывают защитное действие в отношении биологических структур [4]. Полагают, что активность супероксиддисмутазы (далее СОД) необходима для защиты организма от генерируемой внутриклеточной перекиси водорода, тогда как активность пероксидазы (далее ПГТ) обуславливает специфические окислительные процессы с участием перекиси, приводящие к образованию важных метаболитов. По изменению уровней активности ферментов можно рассуждать о том, как клетка справляется со стрессом. [5,6]. Как показали наши исследования, вегетативные *in vitro* органы кровохлебки различного периода культивирования отличаются по содержанию белка и активности главных антиоксидантных ферментов в корнях, стеблях и настоящих листьях (таблица 1). Известно, что клетки растений, вводимые в культуру, испытывают окислительный стресс уже на этапе вычленения экспланта и далее в процессе культивирования уровень стресса возрастает вследствие специфических условий *in vitro* [3,7,8]. В качестве контроля был выбран стебель. Листья 20-ти дневных растений характеризуются повышенным содержанием белка (таблица 1) относительно контроля, где его количество выше в 3,5 раза.

Таблица 1. Биохимическая характеристика *in vitro* сеянцев *S. officinalis*

Образец	Содержание белка (мг/мл)	Активность пероксидазы (у. е./мг белка)	Активность СОД (у. е./мг белка)
20-ти дневные сеянцы			
Корень	*1,500±0,037	*1984,126±20,230	*254,790±1,058
Стебель	0,599±0,044	71,378±5,077	90,471±1,213
Лист	*2,113±0,064	*5550,479±32,100	*259,737±6,190
45-ти дневные сеянцы			
Корень	*0,464±0,075	*1046,334±129,490	*202,773±13,690
Стебель	0,651±0,028	1197,649±83,047	216,084±7,502
Лист	*1,238±0,042	1831,802±122,889	*253,962±5,660

* – различия достоверны по сравнению со значениями других вариантов при $p \leq 0,05$

Количество белка в корне в 2,5 раза больше, чем в стебле, что связано в первую очередь с переходом к гетеротрофному типу питания и достаточно сильно развитой корневой системой кровохлебки в условиях *in vitro*. При анализе содержания белка в более длительнопассируемой культуре отмечается уменьшение содержания белка относительно начальных этапов (20-ти дневных растений), однако уровень белка выше в листьях и корнях в 1,9 и 1,2 раза, соответственно.

Изменение активности СОД коррелируется с содержанием белка. 20-ти дневные *in vitro* растения кровохлебки лекарственной характеризуются повышенной активностью СОД относительно контроля. Так, активность фермента выше в 2,9 раз в листьях, и в 2,8 раз в корнях. По истечению времени, в 45-ти дневных *in vitro* растения кровохлебки активность СОД в листьях и корнях остается практически на том же уровне (253,962 и 202,773 у. е./мг белка, соответственно). Лишь активность СОД в стебле увеличивается в 2,4 раза относительно более ранних этапов культивирования, что объясняется повышенной нагрузкой в связи с увеличением вегетативной массы и интенсификацией обменных процессов. Активность ПГТ характеризуется (таблица 1) высокими значениями у 20-ти дневных растений: активность ПГТ выше в 77,8 раз в листьях, а в корнях в 27,8 раз, относительно контроля. С увеличением времени культивирования, у 45-ти дневных растений отмечается относительная стабилизация уровней ферментов во всех исследуемых органах. Как и в случае с СОД, активность ПГТ в стебле возрастает и составляет 1197,649 у. е./мг белка. Активность ПГТ в 45-ти дневных листьях выше контроля в 1,5 раза. Вероятно, достаточно высокие уровни активности белка, СОД и ПГТ послужили одной из причин хорошего развития вегетативной и корневой массы кровохлебки лекарственной, в связи с интенсификацией метаболических процессов. Эти изменения, вероятно, свидетельствуют о снижении уровня окислительного стресса на организм в целом.

На основании полученных данных была разработана схема введения в культуру *in vitro* *Sanguisorba officinalis* L. Установлено, что наилучшим способом стерилизации является промывание в хозяйственном мыле и замачивание в 0,2 % растворе контактного фунгицида «Дитана» в течение 10 минут и 5 % растворе гипохлорита кальция в течение 10 минут с последующим трехкратным промыванием автоклавированной водой. При данном способе наблюдается высокая стерильность и жизнеспособность семян: жизнеспособность – 55 %, их стерильность – 94 %. При переходе к гетеротрофному способу питания, растения кровохлебки лекарственной испытывает стресс, который проявляется в изменении основных антиоксидантных ферментов: ПГТ и СОД, однако, при увеличении времени пассирования уровень активности ферментов снижается, что вероятно, свидетельствует о переходе культуры на другие уровни регуляции биохимических процессов.

Список литературы

1. Jung Ho Han. The Oral Administration of *Sanguisorba officinalis* Extract Improves Physical Performance through LDHA Modulation. *Molecules*, 2021, 26, 6, 1579.
2. Мальцева Е. М. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L. собранной в различные фазы развития. *Медицина в Кузбассе*, 2017, 6, 2, 32–38.
3. Jang H. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three chinese medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 103, 3, 749–756.
4. Yahraus T. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiology*, 1995, 109, 4, 1259–1266.
5. Cassells A. C. Oxidative and physiological, epigenetic and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 2001, 64, 2/3, 145–157.
6. Schnell D. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, 1994, 266, 5187, 1007–1012.
7. Константинов Ю. М. Возможный свободнорадикальный механизм возникновения соматической изменчивости у растений. Сборник докладов VII Всесоюзного симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов», 1991, 127–129.
8. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. *Наука*, 1993, 147–173.