

УДК 631.147+631.526.3+631.527

**Редакционная коллегия:**

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

**СПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТА НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА В КАЧЕСТВЕ  
СТИМУЛЯТОРА СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ  
В ДЛИТЕЛЬНОПАССИРУЕМЫХ КАЛЛУСАХ**

***AGASTACHE RUGOSA* (FISCH. & C.A.MEY.) KUNTZE (ЧАСТЬ 3)**

А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, А.М. Деева, С.Г. Азизбекян\*, В.Н. Решетников  
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, ул. Сурганова,  
2В, 220012, Беларусь, [floraia@nm.ru](mailto:floraia@nm.ru)

\* ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», г. Минск, .  
Сурганова, 13, 220072, e-mail: [mechanochem@ifoch.bas-net.by](mailto:mechanochem@ifoch.bas-net.by)

*Ключевые слова: Agastache rugosa (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, каллус, наночастицы селена, биологически активные вещества*

**Введение.** Как правило, уровни накопления ценных вторичных метаболитов в культурах *in vitro* ниже, чем в исходном растении. Усиления продукции вторичных метаболитов добиваются за счет усовершенствование исходных сортов растений, отбора высокопродуктивных клеточных линий и направленной регуляции биосинтеза ценных соединений в клеточных культурах растений. Последнюю стратегию осуществляют с помощью физических (например, обработка культур *in vitro* ультрафиолетом), биологических (использование биогенных элиситоров) и химических (применение сигнальных молекул, введение в среду культивирования предшественников интересующих соединений) факторов, а также через изменение условий культивирования и проведение биотрансформации или иммобилизации клеток\тканей [1].

В качестве стимуляторов синтеза БАВ в *in vitro* культурах лекарственных растений перспективными могут быть препараты наночастиц микроэлементов. Исследования по использованию наночастиц микроэлементов в биотехнологии лекарственных растений проводятся в Отделе биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» совместно с Институтом физико-органической химии НАН Беларуси, Отделом высокомолекулярных соединений, Группой механохимии высокомолекулярных соединений, которая к настоящему времени синтезировала и стабилизировала целый ряд микроэлементов. Наночастицы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств тех же веществ в форме дисперсий частиц микронного и более крупного размера:

- настолько малы, что способны проникать через клеточную стенку и мембраны живой клетки вместе с жидкой фазой;
- характеризуются очень высокой удельной (в расчёте на единицу массы) поверхностью, что увеличивает их адсорбционную ёмкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства.
- обладают пролонгированным действием, что отличает их от других соединений (солей, хелатов) [2].

Возможными направлениями использования препаратов наночастиц микроэлементов в биотехнологии растений могут быть: 1) включение их в среды культивирования *in vitro* растений в качестве компонентов; 2) как веществ-элиситоров

БАВ в культурах *in vitro* растений; 3) как адаптогенов в технологии клонального микроразмножения растений — при переводе их из условий *in vitro* в *ex vitro* (для хозяйственно-ценных, в том числе декоративных, а также редких и исчезающих растений); 4) для обогащения лекарственных растений и культур их клеток микроэлементами, эссенциальными для человека.

Нами для усиления биосинтеза вторичных метаболитов в длительнопассируемых каллусных культурах *A. rugosa* (10, 14, 17-ый пассажи) листового и стеблевого происхождения использовался препарат наночастиц селена (наноSe).

Цель нашего исследования — изучить, как препарат наноSe поглощается каллусными клетками *A. rugosa* и влияет на биосинтез БАВ в них.

**Материалы и методы.** Каллусы инициировали в темноте из листьев и стеблей асептических растений *A. rugosa* на твердой ½ среде МС с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Каждые 15-16 дней каллусы пассировали на новую среду. Перед последним пассажем листовых и стеблевых каллусов в среду культивирования добавляли 10 или 50 мг/л препарата наноSe (рисунок 1). У каллусов 14-го пассажа анализировали суммарное содержание фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот, у каллусов 10 и 17-го пассажей определяли общую антиоксидантную активность (АОА). Биологические эффекты препарата наноSe оценивали в сравнение с каллусами (контроль), пассируемыми на среде МС, содержащей лишь гормоны. Препарат наноSe в виде стабилизированного коллоидного раствора наночастиц (35-60 нм) аморфного Se синтезирован в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», там же была определена способность каллусов *A. rugosa* поглощать наночастицы селена из среды культивирования методом атомно-эмиссионной спектроскопии. Приготовление экстрактов всех исследуемых образцов проведено согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь [3] с нашими модификациями (проводили двукратную экстракцию веществ 70%-ным (о/о) этиловым спиртом). Содержание флавоноидов определяли в пересчете на лютеолин согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь [3] с нашими модификациями (измерения при длине волны 330 нм), оксикоричных кислот — согласно [4] (измерения при длине волны 330 нм). Испытуемый раствор — полученный спиртовой экстракт фенольных веществ без дополнительного разведения. Компенсационный раствор — 70 % (о/о) раствор этилового спирта. Оптическую плотность растворов измеряли в кварцевых кюветах толщиной 1 см. АОА экстрактов определяли по [5] в реакции с катион-радикалами 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновой кислоты (АБТС<sup>+</sup>) в виде диаммонийной соли, в качестве окислителя применяли персульфат калия (измерения во времени при температуре 25°C и постоянном помешивании раствора при 734 нм). Для характеристики АОА использовали значение оптической плотности спустя 1 и 6 минут после смешивания. АОА экстрактов растений определялась относительно стандарта тролокса.

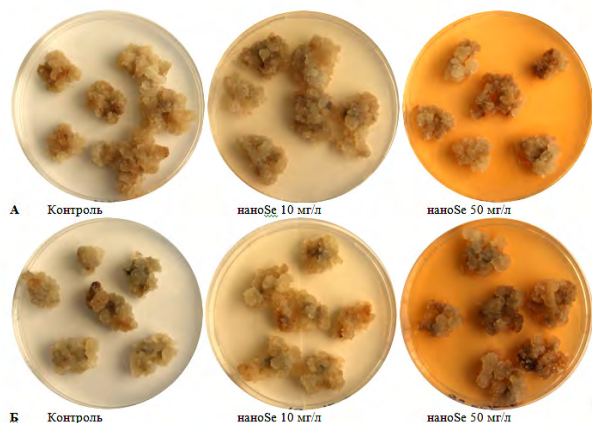


Рисунок 1 — Внешний вид листовых (А) и стеблевых (Б) каллусов *A. rugosa* 14-го пассажа на среде культивирования без и с добавлением препарата наноSe

**Результаты и их обсуждение.** Методом атомно-эмиссионной спектрометрии была исследована способность каллусов *A. rugosa* поглощать наночастицы селена из среды культивирования. В результате было обнаружено (таблица 1), что клетки листового каллуса поглощают наноSe из среды лучше, чем клетки стеблевого. Однако, что интересно, клетки стеблевого каллуса *A. rugosa* сами по себе содержат в 4 раза больше Se (36,5 ppm), чем клетки листового каллуса и в 5 раз больше, чем, например, растения расторопши пятнистой [6].

Таблица 1 — Поглощение наноSe и селенита натрия каллусами *A. rugosa* (14-ый пассаж)

Среда культивирования	Содержание Se, ppm (мкг/г сырой ткани)	
	Листовой каллус	Стеблевой каллус
Среда МС с гормонами (контроль)	9,4	36,5
Среда МС с гормонами + 10 мг/л наноSe	163,1	117,2
Среда МС с гормонами + 50 мг/л наноSe	702,7	368,3

Анализ содержания БАВ в длительнопассируемых каллусных культурах *A. rugosa* (14-ый пассаж), культивируемых в течение 15-ти дней на среде с препаратом наноSe (таблица 2), выявил незначительную стимуляцию биосинтеза БАВ лишь в стеблевом каллусе на среде с 50 мг/л наноSe. Так, в данном каллусе содержание флавоноидов увеличилось на 16,67%, а оксикоричных кислот, к которым относится розмариновая кислота, — на 17,57%. В стеблевом каллусе на среде с 10 мг/л наноSe, как и в листовом каллусе на 2-х испытываемых средах, наблюдалось снижение содержания БАВ на ~10–20 %.

Таблица 2 — Содержание БАВ в контрольных и культивируемых на среде с наноSe каллусах *A. rugosa* 14-го пассажа

Образец	Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в % на грамм сырого веса	% от контроля	Содержание оксикоричных кислот в ммоль/л на грамм сырого веса	% от контроля
Листовой каллус				
Среда МС с гормонами (контроль)	0,038±0,003	100	1,123±0,062	100
Среда МС с гормонами + 10 мг/л наноSe	0,034±0,004	89,47	1,014±0,074	90,29
Среда МС с гормонами + 50 мг/л наноSe	0,031±0,002	81,58	0,924±0,051	82,28
Стеблевой каллус				
Среда МС с гормонами (контроль)	0,030±0,001	100	0,888±0,083	100
Среда МС с гормонами + 10 мг/л наноSe	0,024±0,001	80	0,698±0,065	78,60
Среда МС с гормонами + 50 мг/л наноSe	0,035±0,003	116,67	1,044±0,054	117,57

Дополнительно нами было оценено действие препарата наноSe на общую АОА каллусных клеток *A. rugosa*, но других пассажей: в листовом каллусе 17-го пассажа и стеблевом каллусе 10-го пассажа. Наши исследования показали (таблица 3), что препарат наноSe, добавленный в культуральную среду в концентрации 10 мг/л, повысил уровень общей АОА каллусных клеток *A. rugosa*, особенно стеблевого происхождения (на ~90%). Причем положительное действие препарата выявлено как по отношению к неферментным компонентам АОА (время реакции системы 1 минута), так

и ферментным (время реакции системы 6 минут). При этом и листовом, и в стеблевом каллусе *A. rugosa* выявленный эффект оказался более слабым на среде с 50 мг/л наноSe, чем при 10 мг/л.

Таблица 3 — Антиоксидантная активность (по АБТС) в контрольных и культивируемых на среде с наноSe каллусах *A. rugosa*

Образец / время реакции	АОА, мкмоль-эквив. тролокса / г ткани			
	1 мин	% от контроля	6 мин	% от контроля
Листовой каллус (17-ый пассаж)				
Контроль	1,031±0,03	100	1,421±0,08	100
Среда МС с наноSe 10 мг/л	1,327±0,06	128,71	1,604±0,09	112,88
Среда МС с наноSe 50 мг/л	1,207±0,09	117,07	1,470±0,08	103,45
Стеблевой каллус (10-ый пассаж)				
Контроль	0,593±0,04	100	0,719±0,03	100
Среда МС с наноSe 10 мг/л	1,138±0,06	191,91	1,382±0,03	192,21
Среда МС с наноSe 50 мг/л	0,657±0,08	110,79	0,943±0,045	131,15

Вышеописанные результаты по АОА позволяют надеяться на стимуляцию препаратом наноSe биосинтеза других БАВ (не флавоноидов и оксикоричных кислот) в каллусных клетках *A. rugosa*, поскольку повышение уровня АОА клеток связано с реакцией на стрессовые условия окружающей среды и, как следствие, с индукцией биосинтеза БАВ.

**Заключение.** Таким образом, нами установлено, что каллусные клетки многоколосника морщинистого обладают выраженной металлофитной способностью по отношению к Se. Величина биологического эффекта препарата наноSe на каллусные клетки *A. rugosa* зависит от происхождения (генотипа) экспланта (лист, стебель). Se, накапливаемый каллусными клетками *A. rugosa*, повышал общую антиоксидантную активность, однако, лишь незначительно индуцировал биосинтез оксикоричных кислот (только в стеблевом каллусе), но не затронул синтез флавоноидов. Тем не менее, в перспективе мы ожидаем выявить стимуляцию препаратом наноSe биосинтеза других БАВ (не флавоноидов и оксикоричных кислот) в каллусных клетках *A. rugosa*, поскольку повышение уровня антиоксидантной активности клеток и синтеза в них белка связано с реакцией на стрессовые условия окружающей среды и, как следствие, с индукцией биосинтеза БАВ.

### Литература

1. Smetanska, I. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures / I. Smetanska // *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*.— 2008.— Vol. 111. — P. 187–228.
2. Zhang, J.S. Biological effects of nano red elemental selenium / J.S. Zhang // *BioFactors* — 2001 — Vol.15 — P. 27–38.
3. Государственная фармакопея Республики Беларусь, в 3-х т.— том 2.— 2008.— с.381.
4. Bauer N., Leljак-Levanic D., Jelaska S. Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth. // *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*.— 2004.— Vol.59c.— p.554–560.
5. Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay / R. Re [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*.— 1999.— Vol. 26, N. 9/10.— P. 1231–1237.
6. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases [Electronic resource]. — 2012.— Mode of access : <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=931> — Date of access : 16.06.2012.

Исследование поддержано грантом НАНБ (БРФФИ) – СО РАН Б12СО-017.