

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
Центральный ботанический сад  
Научно-практический центр по биоресурсам  
Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича  
Институт леса



## **Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов**

Материалы III Международной конференции,  
посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского  
(7–9 октября 2015 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях  
Часть 1**

**Секция 1. Ресурсы и биоразнообразие растительного мира:  
современное состояние, воспроизводство, охрана  
и устойчивое использование**

**Секция 2. Современные направления изучения  
ботанических коллекций для сохранения  
и рационального использования  
биоразнообразия растительного мира**

Минск  
«Конфидо»  
2015

УДК 502.174:574.1(082)

ББК 20.18я43

П78

**Редакционная коллегия:**

*д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.В. Титок (ответственный редактор),*

*д.б.н. Е.И. Анисимова,*

*к.б.н. Б.Ю. Аношенко,*

*к.б.н. Д.Б. Беломесецева,*

*к.б.н. П.Н. Белый,*

*д.б.н. Е.И. Бычкова,*

*к.б.н. Т.В. Волкова,*

*к.б.н. Л.В. Гончарова,*

*д.б.н. С.А. Дмитриева,*

*к.б.н. Е.Я. Куликова,*

*к.б.н. А.В. Пугачевский,*

*д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.П. Семенченко,*

*к.б.н. В.А. Цинкевич*

Материалы печатаются в авторской редакции.

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций.

П78 **Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов:** материалы III Международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. (7–9 октября 2015, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск: Конфидо, 2015. – 514 с.

ISBN 978-985-6777-74-8.

В сборнике представлены материалы III Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов», посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. Часть 1: секция 1 «Ресурсы и биоразнообразие растительного мира: современное состояние, воспроизводство, охрана и устойчивое использование» и секция 2 «Современные направления изучения ботанических коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растительного мира».

**УДК 502.174:574.1(082)**

**ББК 20.18я43**

**ISBN 978-985-6777-74-8**

© ГНУ «Центральный ботанический сад  
Национальной академии наук Беларуси», 2015  
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2015

## Культура «бородатых корней» шлемника байкальского – эффективная альтернативная система для получения ценных флавоноидов

Кузовкова А.А., Фоменко Т.И., Копач О.В., Чижик О.В., Спиридович Е.В., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
annalnets.kuzovkova@gmail.com

**Резюме.** Исследовано влияние среды культивирования и ауксинов на содержание сухих веществ и накопление флавоноидов в культуре «бородатых корней» шлемника байкальского. В качестве среды культивирования для данной культуры равнозначно могут быть использованы среды B5, 1/2 B5 и 1/2 MS. Выход флавоноидов на данных средах без использования стимуляторов биосинтеза вторичных метаболитов составил более 3 %. Применение ауксинов нецелесообразно при культивировании «бородатых корней» *Scutellaria baicalensis* как источника суммы флавоноидов.

**Summary.** Kuzovkova A.A., Fomenko T.I., Kopach O.V., Chijik O.V., Spiridovich E.V., Reshetnikov V.N. **Hairy root cultures of baikal skullcap – an effective alternative system for receiving valuable flavonoids.** Influence of media and auxins on growth and flavone production in hairy root cultures of baikal skullcap was investigated. The B5, 1/2 B5 and 1/2 MS media can be used equivalent as the cultivation media for this culture. The flavonoid yield made over 3 % on these media without use of the secondary metabolite biosynthesis stimulators. The use of auxins is inexpedient for the cultivation of the *Scutellaria baicalensis* hairy root culture as the flavonoid sum source.

Шлемник байкальский – самый известный представитель рода *Scutellaria* семейства *Lamiaceae* – обладает широчайшим спектром как летучих, так и нелетучих биологически активных веществ (БАВ). Метаболомный анализ *S. baicalensis* показал, что растение в целом содержит более 2000 химических соединений, среди них 781 предположительно имеет лекарственные свойства (Murch et al., 2004). В китайской и японской традиционной

медицине более 2000 лет используются корни шлемника байкальского как антибактериальное, противовирусное, диуретическое, антиспазмолитическое, противовоспалительное, отхаркивающее, противоглистное, противоопухолевое, желчегонное и омолаживающее средство. (Zobayed et al., 2004; Kim et al., 2012). В китайской традиционной медицине *S. baicalensis* входит в 50 фундаментальных растений (является одним из топ-10 наряду с женьшенем, аралией и элеутерококком), носит название huang qin («хонг лен»). Современной химической наукой подробнее изучен комплекс БАВ корней шлемника байкальского, чем его надземной части. Из корней *S. baicalensis* выделены разнообразные флавоны, фенолэтаноиды, аминокислоты, стероиды и эфирные масла. К настоящему времени в данном виде обнаружено 125 соединений фенольной природы с разнообразной структурой. Среди фенольных соединений корней *S. baicalensis* особенно интересны флавоноиды – их обнаружено более 30 (Kim et al., 2012). По разным данным, общее содержание флавоноидов в корнях *S. baicalensis* может колебаться от 5 до 23 % от сухого веса в зависимости от места произрастания. Так, в корнях шлемника байкальского, выращенного на Украине, этот показатель один из самых высоких и составляет 21,33–22,82 (Гольдберг и др., 1994), в Японии – 8,11–23,14 (Tomimori et al., 1985), в Корею – 12,70–15,10, в Китае – 9,93–12,07 (Tani et al., 1985), в Гонконге – 5,19–9,53 % (Tani et al., 1985). Доминирующими соединениями подземных органов являются байкалин (до 90 % от общего содержания флавоноидов), вогонин и вогонозид, реже встречаются байкалин популяции с преобладанием байкалеина (Гонконг, Япония) (Tomimori et al., 1985; Tani et al., 1985) [1–10].

Учитывая, что ареал обитания *S. baicalensis* ограничен, его заготовка как ценного лекарственного растения может привести к истощению природных популяций, поэтому большую роль приобретает изучение альтернативных возможностей получения ценных БАВ шлемника байкальского. В частности, с помощью биотехнологических методов, используя способность почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* вызывать у широкого круга растений болезнь корней, проявляющуюся в их неконтролируемом разрастании и ветвлении, получены культуры «бородатых корней» (hairy root culture) *S. baicalensis*. Культуры «бородатых корней» широко апробированы в качестве эффективной альтернативной системы для получения вторичных метаболитов из лекарственных растений вследствие их генетической и биохимической стабильности, быстрого роста и способности синтезировать природные соединения на уровнях, сравнимых с таковыми в растениях, выращенных *in vivo* (Giri and Narasu, 2000; Guillon et al., 2006). Ряд факторов, включая температуру, свет, pH, состав среды и экзогенную обработку регуляторами роста, оказывает влияние на продукцию вторичных метаболитов в культурах «бородатых корней» различных растений (Bourgand et al., 2001).

В Институте физиологии растений РАН (г. Москва) была получена стабильная культура hairy root *S. baicalensis* для целенаправленной продукции флавоноидов. В ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» исследовано влияние двух стандартных сред культивирования (полной и половинной сред Мурасиге-Скуга (МС) и Гамборга (В5)) и ауксинов (индолилуксусной (ИУК) и индолилмасляной (ИМК) кислот в концентрации 1 мг/л) на биосинтез флавонов в данной культуре «бородатых корней» *S. baicalensis*. Для сравнения также использовали каллусы от корней растений *in vitro* и от той же культуры «бородатых корней» *S. baicalensis*, пассируемые на среде В5 с 1 мг/л 2,4-D и 1 мг/л кинетин. На данных средах, дополненных 3 % сахарозы, корни культивировали в течение 24 дней, каллусы – в течение 12 дней. Спиртовые экстракты фенольных соединений из культур *in vitro* готовили согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь (2008). Содержания флавоноидов в экстрактах оценивали согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь (2008) в пересчете на лютеолин.

Как видно из табл. 1, наибольшим количеством сухих веществ характеризовалась культура hairy root *S. baicalensis* на полной среде МС, а наименьшим – на среде 1/2 МС.

Как показали исследования Young Seon Kim et al. (2012), тип среды культивирования сильно влиял и на биосинтез флавонов в культуре hairy root *S. baicalensis*. Уровни байкалина в трансформированных корнях шлемника байкальского при культивировании на половинной среде В5 (59,76 мкг/мг) были в 2,5 раза больше, чем на полной среде МС, в 1,7 раза

Таблица 1. Количество сухих веществ в клетках культур *in vitro* *S. baicalensis* на различных средах

Культура <i>in vitro</i>	Среда культивирования	Количество сухих веществ в клетках, %
«Бородатые корни»	B5	4,88±0,57
	1/2 B5	4,51±0,16
	MC	6,53±0,54
	1/2 MC	4,38±0,46
	B5+ИМК	4,66±0,72
	B5+ИУК	5,19±0,67
Корневой каллус от растений <i>in vitro</i>	B5+2,4-D+кинетин	3,38±0,05
Корневой каллус от «бородатых корней»	B5+2,4-D+кинетин	3,56±0,09

больше, чем на половинной среде Шенка и Хильдебрандта (SH, Schenk and Hildebrandt), в 1,6 раза – чем в половинной среде MC, в 1,5 раза – чем на полной среде B5 и SH. Сходная тенденция наблюдалась и для байкалеина и вогонина: наивысшая продукция данных флавонов обнаружена в корнях на половинной среде B5 (22,61 мкг/мг), что в 2,1 раза больше, чем на половинной среде MC, в 2 раза – чем на полной среде B5, в 1,8 раза – чем на полной среде SH, в 1,7 раза – чем на полной среде MC, в 1,5 раза – чем на половинной среде SH. Самые высокие уровни содержания вогонина (4,47 мкг/мг) в «бородатых корнях» шлемника байкальского также накапливались на половинной среде B5 и были в 1,5 раза больше, чем таковые на половинной среде MC (самые низкие уровни накопления вогонина).

В проводимых исследованиях тип среды культивирования также влиял на биосинтез флавоноидов в культуре hairy root *S. baicalensis*, но изменения были не настолько выраженными, как в экспериментах Young Seon Kim et al. (2012). Как видно из табл. 2, содержание суммы флавоноидов в клетках «бородатых корней» шлемника байкальского, культивируемых на средах B5, 1/2 B5 и 1/2 MC, было практически одинаковым и колебалось от 3,333 до 3,438 %. Самый низкий показатель накопления флавоноидов отмечен в культуре hairy root *S. baicalensis* на полной среде MC и составил 1,934 %, что практически на половину меньше, чем на 1/2 MC.

При анализе влияния различных ауксинов на биосинтез флавонов в «бородатых корнях» шлемника байкальского (Young Seon Kim et al. (2012)) в качестве базовой среды культивирования использовали половинную среду B5 как оптимальную по показателям роста культуры и уровням накопления ценных БАВ. Корейские ученые оценивали действие ИУК, индоллил-3-бутировой (ИБК) и нафтилуксусной (НУК) кислот в концентрациях 0,1;

Таблица 2. Содержание суммы флавоноидов (в % в пересчете на лютеолин и сухой вес) в клетках культур *in vitro* *S. baicalensis* на различных средах

Культура <i>in vitro</i>	Среда культивирования	Содержание суммы флавоноидов, %
«Бородатые корни»	B5	3,334±0,002
	1/2 B5	3,381±0,002
	MC	1,934±0
	1/2 MC	3,438±0,002
	B5+ИМК	2,967±0,001
	B5+ИУК	2,465±0,001
Корневой каллус от растений <i>in vitro</i>	B5+2,4-D+кинетин	4,443±0
Корневой каллус от «бородатых корней»	B5+2,4-D+кинетин	4,932±0

0,5 и 1,0 мг/л. Результаты исследований корейских ученых показали, что внесение в среду культивирования вариантов ауксинов по-разному изменяло содержание БАВ в «бородатых корнях» шлемника байкальского. Среди всех исследуемых вариантов ауксинов ИУК в концентрации 1,0 мг/л оказала наивысший стимулирующий эффект на биосинтез сразу двух флавононов — байкалина (его содержание возросло с 59,76 до 72,74 мкг/мг) и байкалеина (с 22,61 до 26,27 мкг/мг). Уровни байкалина также возрастали с 59,76 до 63,00 мкг/мг при ИУК в концентрации 0,10 мг/л. Остальные варианты внесения в половинную среду В5 ауксинов не оказывали стимулирующего действия на накопление байкалина в «бородатых корнях» шлемника байкальского. Уровни содержания байкалеина в исследуемой культуре *in vitro* возрастали, но незначительно, при внесении практически всех вариантов ауксинов, за исключением 0,5 мг/л ИУК, 1,0 мг/л ИБК и 0,1 мг/л НУК. Уровни накопления вогонина в «бородатых корнях» шлемника байкальского также возрастали под действием практически всех вариантов ауксинов, кроме 0,1 и 1,0 мг/л НУК. Наивысшее содержание вогонина отмечено в трансформированных корнях *S. baicalensis* на половинной среде В5 с 1,0 мг/л ИБК – в 1,4 раза больше, чем в контроле (6,99 против 5,00 мкг/мг). Высокие уровни вогонина были и в культуре на среде, дополненной 0,1 мг/л ИБК (6,46 против 5,00 мкг/мг).

Исследовано влияние ауксинов ИУК и ИМК в концентрации 1,0 мг/л на накопление сухих веществ и биосинтез флавоноидов в «бородатых корнях» шлемника байкальского. В качестве базовой среды культивирования авторы статьи, как и Young Seon Kim et al. (2012), использовали половинную среду В5. Как показали результаты эксперимента (табл. 1), ИМК и ИУК повышают содержание сухих веществ в клетках трансформированных корней *S. baicalensis* соответственно примерно на 3 и 15 %. При этом оба гормона снижали биосинтез флавоноидов в данной культуре – ИМК ~ на 12, а ИУК ~ на 27 % по сравнению с базовой средой 1/2 В5 (табл. 2) (отрицательное сальдо соответственно 9 и 12 %). Полученные результаты указывают, что применение ауксинов нецелесообразно при культивировании «бородатых корней» как источников суммы флавоноидов.

Также был проведен сравнительный анализ культуры «бородатых корней» на среде В5 и корневых каллусов *S. baicalensis* (от корней растений *in vitro* и от той же культуры «бородатых корней») на среде В5 с 2,4-D и кинетином по двум вышеуказанным показателям. Как следует из табл. 1, 2, самой эффективной альтернативной системой для получения вторичных метаболитов из шлемника байкальского является каллус, иницированный из культуры hairy root. В этой культуре *in vitro* по сравнению с «бородатыми корнями» на фоне снижения на 27 % содержания сухих веществ происходит усиленное накопление флавоноидов – примерно на 48 % (положительное сальдо 21 %). Однако здесь следует учитывать меньшие генетическую и биохимическую стабильности и скорость роста каллусов по сравнению с культурой органов (в частности, с культурой «бородатых корней»).

Таким образом, «бородатые корни» шлемника байкальского являются эффективной альтернативной системой для получения ценных вторичных метаболитов. Из них выход флавоноидов в пересчете на лютеолин и сухой вес без добавления в среду культивирования стимуляторов биосинтеза БАВ составил более 3 %, тогда как из корней диких растений чаще всего бывает 5–15 % и только в редких случаях – более 20 %. В качестве среды культивирования для hairy root *S. baicalensis* могут быть использованы три среды: В5, 1/2 В5 и 1/2 МС.

Авторы выражают благодарность заведующей группой специализированного метаболизма корней Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН (Москва, Россия), к. б. н. И.Н. Кузовкиной за предоставленную культуру hairy root *S. baicalensis*, а также заведующему отделом биологии клетки и биотехнологии того же института, д. б. н. А.М. Носову за содействие в организации исследований.

#### Список литературы

1. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) genotypes discovery of novel compounds / S.J. Murch [et al.] // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 23. – P. 419–425.
2. Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemopreventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi / S.M.A. Zobayed [et al.] // Plant Sci. – 2004. – Vol. 167. – P. 439–446.

3. Tang, W., Chinese drugs of plant origin / W. Tang, G. Eisenbrand // Springer. – Berlin, 1992.
4. Influence of media and auxins on growth and flavone production in hairy root cultures of baikal skull-cap, *Scutellaria baicalensis* / Y.S. Kim [et al.] // Plant Omics Journal. – 2012. – Vol. 5, No 1. – P. 24–27.
5. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства / Е.Д. Гольдберг [и др.]. – Томск, 1994. – 222 с.
6. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria discolor* Colebr. / T. Tomimori [et al.] // Chem Pharm Bull. – 1985. – Vol. 33. – P. 4457–4463.
7. Histochemistry. VII. Flavones in *Scutellaria Radix* / T. Tani [et al.] // Chem Pharm Bull. – 1985. – Vol. 33. – P. 4894–4900.
8. Giri, A., Transgenic hairy roots: recent trends and applications / A. Giri, M.L. Narasu // Biotechnol Adv. – 2000. – Vol. 18. – P. 1–22.
9. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects / S. Guillon [et al.] // Curr Opin Plant Biol. – 2006. – Vol. 9. – P. 341.
10. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / F. Bourgaud [et al.] // Plant Sci. – 2001. – Vol. 161. – P. 839–851.
11. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 3-х т. – 2008. – Т. 2. – С. 381.