

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

5. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1982. 549 с.

6. Экспертиза грибов: учеб.-дел. пособие / И.Э. Цапалова, В.И. Бакайтис, Н.П. Кутафьева, В.М. Позняковский. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та; Сиб. унив. изд-во, 2002. 256 с.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ СОМАКЛОНОВ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО (*AGASTACHE RUGOSA* (FISCH. ET MEY.) KUNTZE)

Мазур Т.В., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В.

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

Разработана биотехнологическая схема клеточной селекции многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), способствующая созданию новых соматональных генотипов лекарственных растений с повышенным содержанием биологически активных веществ.

Ключевые слова: биотехнология, культура *in vitro*, многоколосник морщинистый, *Agastache rugosa* (Fisch. Et Mey.) Kuntze, соматоклоны, полифенольные соединения.

Одной из характерных особенностей высших растений является их способность к образованию и накоплению веществ вторичного метаболизма, представленных различными группами соединений, которые защищают растения от абиотических и биотических факторов [1, 2]. В медицине вещества вторичного метаболизма называют биологически активными веществами (БАВ) и именно они, обладая лечебным действием, обуславливают ценность лекарственного сырья. Для решения вопросов, связанных с образованием, метаболизмом и функциями БАВ, широко используются культуры клеток и тканей растений в качестве модельной системы, а также для решения прикладных задач создания новых сортов, производства лекарственных препаратов. К традиционным способам повышения продуктивности клеток и тканей *in vitro* относятся клеточная селекция, оптимизация сред, элиситация, использование предшественников синтеза, иммобилизация клеток и др. [3]. Для производства вторичных метаболитов на основе ССА (compact callus aggregates) получены суспензионные культуры родиолы сахалинской (*Rhodiola sachalinensis*) [4], родиолы розовой (*R. rosea*) [5], катарантуса розового (*Catharanthus roseus*) [6]. Однако в ряде случаев ССА не аккумулировали интересные метаболиты, например, в лимоннике китайском (*Schizandra chinensis*) [7]. Также есть примеры накопления антидепрессантов в значительно больших количествах в микрорастениях зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), чем в культуре ССА [8]. Таким образом, составление схемы культивирования *in vitro* является стратегическим моментом в биотехнологии, требующим особого внимания.

Строгой классификации БАВ до настоящего времени не разработано. По химической классификации наиболее значимыми БАВ являются каротиноиды, глюкозинолаты, фитоэстрогены, фитостерины, фенольные соединения (ФС), ингибиторы протеаз, сапонины, сульфиды, терпены. ФС — один из важнейших классов вторичных метаболитов. Разнообразие функций ФС в растительной клетке в сочетании с широким спектром биологического действия на живые организмы определяют актуальность и интерес к изучению этого класса соединений [9]. Стабильность синтеза вторичных метаболитов неодинакова для различных классов соединений и для различных клеточных культур. Показано, что синтез вторичных соединений значительно изменяется при переходе клеточной культуры к образованию дифференцированных морфогенных структур [10]. В то же время практически отсутствуют данные об изменениях вторичного метаболизма у соматоклонов, полученных при прямом или непрямом морфогенезе в культуре тканей [11].

Целью наших исследований являлось получение в условиях *in vitro* соматоклонов многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), оценка их по биохимическим признакам — идентификация и изучение состава фенольных соединений.

Agastache rugosa (Fisch. et Mey.) Kuntze — многоколосник морщинистый используется как пряно-ароматическое и лекарственное растение. Из разных частей многоколосника выделили 71 БАВ, которые обладают широчайшим биологическим действием, от противовоспалительного до противоопухолевого. *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze является сильнейшим биостимулятором, соперничающим с женьшенем [12].

Культура ткани. Для введения в культуру *in vitro* были использованы семена *Agastache rugosa*. Стерильные семена проращивали в темноте при 24° С на среде Мурасиге-Скуга (МС). После прорастания семена переносили на свет в люминостат и культивировали при температуре 23...25° С, освещенности 2500—3000 лк и 16-часовом фотопериоде.

Морфогенез: листовые и стеблевые экспланты одинакового размера культивировали на модифицированной питательной среде МС: тиамин гидрохлорид (2 мг/л), пиридоксин гидрохлорид (0,8 мг/л), гидролизат казеина (500 мг/л), сахароза (20 г/л) с добавлением различных концентраций фитогормонов: кинетин в концентрации 1, 2, 3 и 4 мг/л + 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК); 6-бензиламинопурин (6-БАП) — 1, 2, 3 и 4 мг/л + 0,2 мг/л ИУК, рН среды 5,6—5,8. Культивирование проводили в темноте при температуре 24,5±0,5° С.

Органогенез *A. rugosa* достигнут варьированием гормонов группы цитокининов и ауксинов. В зависимости от содержания определенных регуляторов роста на листьях и стеблях многоколосника морщинистого наблюдали каллусогенез, индукцию и формирование адвентивных почек и побегов (приложение, рис. 3) [13].

На морфогенных средах с добавлением 6-БАП в концентрации 1 мг/л и ИУК 0,2 мг/л получен стабильный стеблевой органогенез из каллусной ткани. Полученные при стеблевом органогенезе побеги переносили на питательную среду МС с половинным составом и добавлением ИУК в концентрации 1 мг/л, которые укоренялись и давали начало целым растениям. В результате проделанной работы в ходе изучения особенностей морфогенеза и влияния различных факторов на развитие изолированных культур была разработана биотехнологическая система создания и размножения новых форм многоколосника морщинистого с использованием методов клеточной инженерии.

Из 36 полученных соматклонов для биохимического анализа были отобраны растения, которые имели выраженные отличия от родительской формы по морфофизиологическим показателям — соматклоны 6, 7, 11, 20, 31, 34, 36. Соматклоны *A. rugosa* проходили адаптационный период при переводе их к условиям *ex vitro*. В дальнейшем вегетация растений происходила на экспериментальных делянках ЦБС НАН Беларуси. В фазе цветения в соматклонах оценили суммарное содержание ФС, флавонолов (класс флавоноидов) и дубильных веществ, а также количество флавоноида акацетина. В итоге были отобраны 5 соматклонов-гиперпродуцентов ФС: Aga11, Aga20, Aga31, Aga34 и Aga36, при этом следует отметить, что соматклон Aga11 получен из листовых, а все остальные — из стеблевых эксплантов.

Биохимический анализ показал отличия соматклонов по суммарному содержанию ФС (табл. 1). Соматклон Aga11 характеризовался самым высоким суммарным содержанием фенолов и, в частности, флавонолов.

Таблица 1
Содержание фенольных соединений в исходной форме и соматклонах *Agastache rugosa*

Растение	Содержание ФС, мг/г сухого вещества	Содержание дубильных веществ, мг/г сухого вещества	Содержание суммы флавонолов, мг/г сухого вещества
Исходная форма	60,0±0,23	73±0,18	1,46±0,21
Aga11	100,0±0,36	106±0,71	10,27±0,33
Aga20	85,7±0,31	138±0,65	5,45±0,29
Aga31	66,4±0,21	108±0,79	3,65±0,41
Aga34	75,8±0,19	97±0,42	6,66±0,15
Aga36	67,5±0,15	—	4,27±0,17

Так, соматклон 11 превышал по сумме фенольных веществ исходное растение на 66,6%, а соматклон 20 — на 42,8%, соматклон 34 — на 26,3%. Имеется и соматклон, у которого количество фенольных сопоставимо с интактным растением — соматклон 7. Таким образом, и по количественному содержанию флавонолов все соматклоны превосходили исходную форму *A. rugosa*, особенно соматклон 11, который превосходил контроль в 7 раз, соматклон 34 — в 4,5 раза и 31 — в 3,7 раза.

Использование ВЭЖХ позволяет эффективно разделить и идентифицировать нелетучие и термолabile компоненты водно-спиртовых экстрактов лекарственных растений, которые невозможно идентифицировать другими методами. В связи с этим проанализирован состав экстрактов и соматклонов *Agastache rugosa* с помощью ВЭЖХ и определен акацетин после кислотного гидролиза. Увеличение площади пика акацетина после проведения гидролиза свидетельствует о присутствии значительного количества гликозилированной формы этого соединения в экстракте многоколосника

морщинистого. Установлено повышение содержания флавоноидов в гидролизатах экстрактов изученных образцов по сравнению с аналогичными, которые не подвергались кислотному гидролизу. Такое повышение можно объяснить тем, что указанные соединения, по-видимому, являются агликоновой частью гликозидов, освобожденной в результате гидролиза.

Сравнительный анализ по количественному содержанию акацетина в исследуемых экстрактах показал, что количество данного флавоноида в соматоклонах сравнимо с интактным растением, и только для клона 20 отмечено незначительное увеличение акацетина (табл. 2).

Таблица 2

Содержание акацетина в исходной форме и соматоклонах *Agastache rugosa*

Растение	Содержание акацетина, мг/ мл
Исходная форма	1,64±0,023
Aga11	1,09±0,025
Aga20	1,74±0,036
Aga31	0,96±0,056
Aga34	1,10±0,073
Aga36	0,92±0,092

Таким образом, при индукции непрямого морфогенеза на основе соматоклональной вариабельности получены соматоклоны многоколосника морщинистого, которые проявили полиморфизм по показателям: сумме ФС, сумме флавонолов. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой активности синтеза ФС и флавонолов в отобранных соматоклонах, максимальные отличия характерны для соматоклона 11. Фармакологическое действие лекарственных препаратов на основе многоколосника морщинистого обеспечивается главным образом за счет флавонолов, которые выступают как гепатопротекторы, а также обладают спазмолитической и гипотензивной активностью. Наиболее интересными и перспективными в коммерческой биотехнологии соматоклонами *A. rugosa* являются Aga11 и Aga20. В настоящее время в Беларуси производится препарат «Агастацин», в состав которого входит экстракт *A. rugosa*. Использование полученных соматоклональных форм многоколосника показывает возможности повышения активности фармсубстанций.

Литература

1. Носов А. М. Функции вторичных метаболитов растений in vivo и in vitro // Физиология растений. 1994. Т. 41, № 6. С. 873—878.
2. 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.
3. Feher A.P, Pasternak T., Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol.74. P. 201—228.
4. Xu J., Su Z., Feng P. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production // Enzyme Microb. Tech. 1998. Vol. 23. P. 20—27.
5. György Z., Hohtola A. Production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiola rosea* through biotransformation of cinnamyl alcohol // Methods Mol Biol. 2009. Vol. 547. P. 305—312.
6. Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2005. Vol. 23, I. 4. P. 283—333.
7. Martin J. et al. In vitro culture establishment of *Schizandra chinensis* (Turz.) Baill. and *Rhodiola rosea* L., two adaptogenic compounds producing plants // Journal of Phytology. Tissue Culture. 2010. Vol. 2, № 11. P. 80—87.
8. Karppinen S.M. et al. Identification of a common polymorphism in the TopBP1 gene associated with hereditary susceptibility to breast and ovarian cancer // Eur. J. Cancer. 2006. Vol.42. P. 2647—2652.
9. Запрометов М. Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. М.: Наука, 1996. 45 с.
10. Rolph C.E., Coad L.J. Phosphatidylcholine biosynthesis in celery cell suspension cultures with altered sterol compositions // Physiol. Plantarum. 1991. Vol. 83, № 4. P. 605—611.
11. Kalpana J. et al. Molecular markers in herbal drug technology // Current Science. 2004. Vol. 87, № 2. P. 159—165.
12. Биологически активные вещества растительного происхождения: в 3 т. М., 2001. С. 740—760.
13. Мазур Т. В., Решетников В. Н. Культивирование многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et. Mey.) Kuntze) in vitro // Вести НАН Беларуси. Сер. Биол. наук. 2005. № 3. С. 5—9.