

<https://doi.org/10.15407/frg2019.06.493>

УДК 582.998.2: [581.143.6: 581.17]

МОДИФИКАТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*SILYBUM MARIANUM* L.) БЕЛОРУССКОЙ И ВЕНГЕРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

О.В. КОВЗУНОВА, В.Н. РЕШЕТНИКОВ

Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси»
220012 Минск, ул. Сурганова, 2в
e-mail: olga-kopa@mail.ru

В качестве модификаторов метаболизма биологически активных веществ (БАВ) клеточных культур *Silybum marianum* красно- и белоцветковой рас может быть использован комплексный препарат наночастиц «Наноплант-Со, Мп, Си, Фе» в концентрации 0,01 мг/л, а также электромагнитное излучение сверхвысокочастотного диапазона волн 65—71 ГГц низкого уровня мощности 10 мВт при экспозиции 20 мин. Длительнокультивируемые суспензионные культуры являются более отзывчивыми на электромагнитную обработку, а каллюсные культуры — на внесение препарата наночастиц металлов.

Ключевые слова: *Silybum marianum* L., расторопша, культура in vitro, наночастицы металлов, электромагнитное поле сверхвысоких частот, флаволигнаны, фенольные соединения, биологически активные вещества.

Лекарственные растения являются природными источниками ценных БАВ, которые обладают широким спектром действия. В настоящее время их применяют как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической промышленности [1]. Альтернативными источниками получения БАВ растительного происхождения являются культуры клеток и тканей растений in vitro. Биотехнологические подходы позволяют получать продукт круглогодично независимо от внешних климатических и почвенных условий [2, 3]. Основной недостаток данных технологий — низкий конечный выход продукта. Вследствие этого актуально определить условия, при которых обеспечивались бы оптимальный рост клеток и высокое содержание вторичных метаболитов в биомассе. Существует ряд химических и физических способов воздействия, регулирующих биосинтез БАВ в культурах in vitro.

В роли химического стимулятора биосинтеза БАВ могут быть использованы наночастицы металлов, так как они представляют собой нерастворимые соединения настолько малых размеров, что способны

проникать сквозь клеточную стенку и мембраны растений вместе с жидкой фазой. Они характеризуются высокими реакционной способностью и каталитической активностью. Являясь кофакторами ферментов, принимают активное участие в регуляции различных жизненных процессов. Наночастицы обладают пролонгированным действием, чем отличаются от других соединений (солей, хелатов). Следует отметить, что расторопша пятнистая характеризуется высокой металлофильностью к ряду микроэлементов [4]. В качестве потенциального модификатора метаболизма клеточных культур *S. marianum* был выбран комплексный препарат наночастиц металлов «Наноплант-Со, Мн, Сu, Fe», который разработан и предоставлен Институтом физико-органической химии НАН Беларуси, отделом высокомолекулярных соединений, группой механохимии высокомолекулярных соединений (руководитель С.Г. Азизбекян).

В качестве физического модификатора метаболизма можно использовать электромагнитное поле сверхвысоких частот (ЭМП СВЧ). Действие ЭМП СВЧ на различные биологические объекты изучается в течение последних 25 лет [5], однако до сих пор клеточные культуры *in vitro* высших растений не были использованы как объекты исследования. В частности, Тамбиев и соавт. [6] изучили влияние ЭМП СВЧ на фотосинтезирующие организмы (одноклеточные водоросли). Установлено, что даже однократное облучение водорослей приводит к увеличению выхода биомассы как минимум в 2 раза, усиливает интенсивность фотосинтеза (до 350 %), повышает уровень экскреции в среду органических соединений. По мнению Тамбиева и соавт. [7], под действием ЭМП СВЧ в клетках водорослей происходят образование и накопление активных радикалов кислорода и пероксидов, что приводит к развитию автокаталитических реакций, которые в итоге вследствие ускорения мембранного транспорта и интенсификации фотосинтетических процессов оказывают стимулирующий эффект на физиологические параметры фотосинтезирующих организмов [8]. Мы предположили, что такой же стимулирующий эффект ЭМП СВЧ по сходному механизму может наблюдаться и для нефотосинтезирующих организмов, в частности, для клеточных культур растений, культивируемых в темноте.

Расторопша пятнистая (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) — известное лекарственное растение с широким спектром терапевтических эффектов [9—11], представляющее собой богатый источник БАВ, масла и микроэлементов [12]. Она характеризуется уникальным комплексом флавонолигнанов (ФЛВ), которые оказывают антигепатотоксическое, гепатопротекторное и антихолестерологическое действие [13, 14]. Известно, что растения, относящиеся к красно- и белоцветковой расам расторопши, характеризуются различной биосинтетической способностью, поэтому необходимо выбрать наиболее перспективные сорта для работы с культурой *in vitro* [15].

Усиления продукции вторичных метаболитов добиваются за счет усовершенствования исходных сортов растений, отбора высокопродуктивных клеточных линий и направленной регуляции в клеточных культурах растений биосинтеза ценных соединений. Количество синтезируемого силимаринового комплекса в клеточных культурах

S. marianum зависит от принадлежности к расе, сорту и выбора эксплантата, взятого для инициации [15].

Для получения клеточных культур *S. marianum*, характеризующихся повышенным содержанием целевых БАВ, следует определить оптимальные режимы обработки каллюсов, а также подобрать концентрации препарата наночастиц металлов, обеспечивающие максимальные уровни содержания активных веществ.

В связи с вышеизложенным целью работы был подбор модификаторов химической и физической природы метаболизма клеточных культур *S. marianum* L. красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции для максимального повышения содержания БАВ.

Методика

Объектами исследования были клеточные культуры корневого и стеблевого происхождения *Silybum marianum* L. красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции. Каллюсы инициировали из стеблевых и корневых эксплантатов расторопши пятнистой — сегментов размером 4 мм, взятых с 17-суточных растений, на среде Мурасиге—Скуга (МС), содержащей гормоны 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,4 мг/л кинетина, с рН до автоклавирования 5,7. Культивирование проводили в темноте при температуре 25 °С [16]. Через 2—3 недели каллюсы пассировали на среду МС с добавлением гормонов 2 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Через каждые 14—17 суток каллюсы пассировали на новую среду [16]. Для получения суспензионной культуры кусочки рыхлого корневого и стеблевого каллюсов красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортообразца Sibilla переносили в перемешиваемую жидкую среду МС с гормонами. При первом переносе удаляли крупные кусочки исходного каллюса и агрегаты клеток. Суспензионную культуру выращивали на жидкой среде МС с добавлением 2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК в круглодонных колбах в люминостате при 24—25 °С на круговой качалке (100—120 об/мин). При пассировании с интервалом 16 суток аликвоту клеточной суспензии ресуспендировали в свежей питательной среде.

В работе использованы классические биотехнологические методы. Общее содержание фенольных соединений (ФС) определяли по методу Фолина—Чокальтеу [17, 18] спектрофотометрически. Сумму флавонолигнанов определяли по методике [19] на спектрофотометре Agilent 8453.

Результаты и обсуждение

На основании экспериментальных и литературных данных [20, 21] нами была рассмотрена возможность использования препарата наночастиц «Наноплант-Со,Мп,Сu,Fe» в качестве потенциального регулятора метаболизма каллюсных культур расторопши пятнистой. В связи с тем что биосинтетический потенциал клеточных культур

красно- и белоцветковой рас расторопши снижается из пассажа в пассаж и после 10-го пассажа становится достаточно низким, биологические эффекты от препарата оценивали на длительнопассируемых культурах.

Биологические эффекты препарата «Наноплант-Со,Мн,Си,Fe» оценивали на 24- и 27-м пассажах стеблевых и корневых каллюсов, полученных от эксплантатов *S. marianum* двух рас — красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортообразца, в двух концентрациях: 0,15 и 1,5 мг/л среды культивирования (концентрации рассчитывались по рекомендации для культур незащищенного грунта).

При внесении в среду культивирования препарата «Наноплант-Со,Мн,Си,Fe» (табл. 1) в концентрации 0,15 мг/л в стеблевом каллюсе 24- и 27-го пассажей красноцветкового сорта содержание ФС увеличивалось соответственно на 16,7 и 52,5 %. В стеблевом каллюсе 27-го пассажа белоцветкового сортообразца содержание ФС повышалось на 106,1 %, а в 24-м пассаже данная концентрация препарата приводила к снижению исследуемого параметра на 21,6 %.

ТАБЛИЦА 1. Суммарное содержание фенольных соединений (мкг/г) в корневом и стеблевом каллюсах 24- и 27-го пассажей *S. marianum* красно- и белоцветковой рас в зависимости от концентрации комплексного препарата наночастиц «Наноплант-Со,Мн,Си,Fe» в культуральной среде

Вариант	24-й пассаж	% контроля	27-й пассаж	% контроля
Красноцветковый сорт Золушка				
Корневые каллюсы				
Контроль	228,720±1,499	100	318,940±2,023	100
Среда с препаратом 0,15 мг/л	263,840±4,180*	115,4	414,360±1,316*	129,9
Среда с препаратом 1,5 мг/л	249,140±4,556*	108,9	302,040±0,707*	94,7
Стеблевые каллюсы				
Контроль	262,340±3,925	100	170,460±2,552	100
Среда с препаратом 0,15 мг/л	306,060±1,299*	116,7	260,020±3,306*	152,5
Среда с препаратом 1,5 мг/л	292,360±1,262*	111,4	227,260±1,914*	133,3
Белоцветковый сортообразец Sibilla				
Корневые каллюсы				
Контроль	186,480±4,310	100	275,180±10,641	100
Среда с препаратом 0,15 мг/л	272,880±1,500*	146,3	495,280±4,594*	180
Среда с препаратом 1,5 мг/л	379,720±2,566*	203,6	345,120±3,138*	125,4
Стеблевые каллюсы				
Контроль	378,960±4,290	100	185,720±0,669	100
Среда с препаратом 0,15 мг/л	297,020±6,625	78,4	382,740±3,043*	206,1
Среда с препаратом 1,5 мг/л	399,600±2,287*	105,4	252,640±3,887*	136

*Здесь и в табл. 2: различия достоверны по сравнению со значениями других вариантов при $p \leq 0,05$.

Добавление в культуральную среду комплексного препарата «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в концентрации 0,15 мг/л в корневом каллюсе 24- и 27-го пассажей красно- и белоцветковой рас приводило к повышению содержания ФС. В корневом каллюсе 24-го пассажа *S. maritima* красно- и белоцветковой рас содержание исследуемых БАВ возросло на 15,4 и 46,3 %, в каллюсе 27-го пассажа — на 29,9 и 80 %.

Повышение концентрации препарата «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в культуральной среде в 10 раз привело к увеличению содержания ФС в стеблевом каллюсе белоцветковой расторопши на 5,4 и 36 % соответственно в 24- и 27-м пассажах, а в корневом каллюсе — на 103,6 и 25,4 %. В корневом и стеблевом каллюсах красноцветкового сорта Золушка 24-го пассажа исследуемый показатель возрос на 8,9 и 11,4 %, в то время как внесение препарата в концентрации 1,5 мг/л в культуральную среду к корневой культуре 27-го пассажа снизило суммарное содержание ФС на 5,3 % и повысило данный показатель в стеблевой культуре сорта Золушка на 33,3 %.

Вероятно, максимальный ответ (повышенный биосинтез ФС) в 27-м пассаже связан с возрастом каллюсной ткани. Со временем в длительнопассируемых клетках каллюсов биосинтез вторичных метаболитов замедлялся, а при добавлении в культуральную среду регуляторов метаболизма, в частности комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в низких концентрациях (0,15 мг/л), активизировался биосинтез БАВ, что наиболее ярко прослеживается на стеблевых каллюсах обеих рас расторопши пятнистой.

Отметив максимальное возрастание биосинтеза БАВ в каллюсных культурах расторопши красно- и белоцветковой рас при добавлении в культуральную среду комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в низких концентрациях, мы предположили, что добавление препарата наночастиц в среду культивирования суспензионной культуры в еще более низких концентрациях по сравнению с концентрациями, используемыми для стимуляции биосинтеза БАВ каллюсными клетками, должно привести к максимальному повышению содержания вторичных метаболитов [22]. В среду культивирования суспензионной культуры расторопши пятнистой двух рас вносили препарат наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в четырех концентрациях: 1,5, 0,15, 0,015, 0,01 мг/л. Биологические эффекты оценивали на суспензионной культуре, инициированной из корневого и стеблевого каллюсов 4-го пассажа [22]. В результате внесения в культуральную среду препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» содержание вторичных метаболитов в суспензионной культуре расторопши пятнистой повышалось (рис. 1).

Так, внесение препарата в корневую культуру расторопши красноцветкового сорта в концентрации 0,01 мг/л увеличивало содержание флавоноидов и ОКК до 162 %, а в стеблевой культуре — до 172 и 200 % соответственно. Концентрация препарата 1,5 мг/л практически не влияла на стеблевую культуру и угнетала биосинтез в корневой суспензионной культуре.

Подобная ситуация наблюдалась и при внесении препарата в суспензионную культуру, инициированную из расторопши белоцветко-

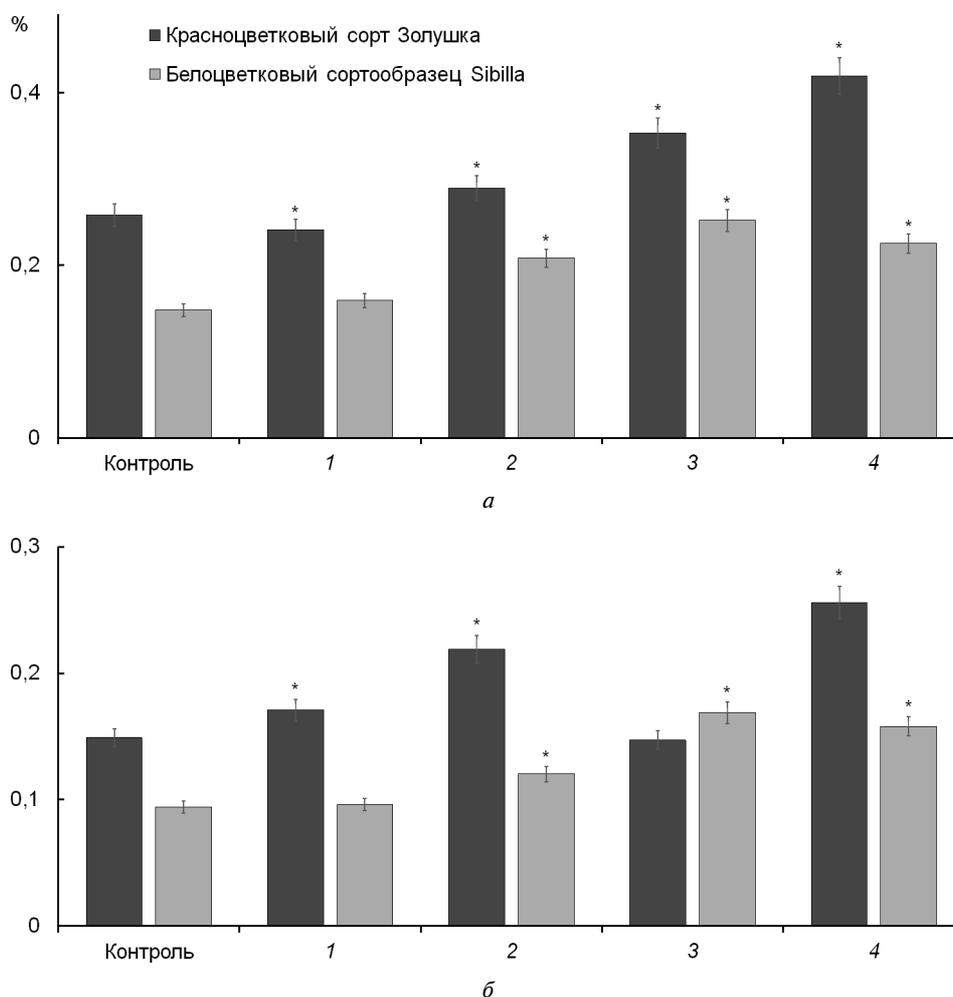


Рис. 1. Содержание биологически активных веществ в суспензионной культуре *S. marianum* красно- и белоцветковой рас в зависимости от концентрации комплексного препарата наночастиц «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в культуральной среде:

а — корневая суспензионная культура; *б* — стеблевая суспензионная культура; 1–4 — среды, содержащие соответственно 1,5; 0,15; 0,015 и 0,01 мг/л препарата. *Здесь и на рис. 2, 3: различия достоверны по сравнению со значениями других вариантов при $p \leq 0,05$

вой расы. Максимальное накопление вторичных метаболитов отмечено при внесении препарата в концентрации 0,015 мг/л среды. В корневой и стеблевой культурах биосинтез флавоноидов и ОКК увеличился в 1,8 раза по сравнению с контролем. Определено, что для расторопши красноцветковой расы оптимальной концентрацией препарата является 0,01 мг/л, а для белоцветковой — 0,015 мг/л [22].

Анализ суммарного содержания ФЛВ как основных БАВ расторопши в каллюсах и суспензионной культуре *S. marianum* (рис. 2) показал, что комплексный препарат наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» оказывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез целевых БАВ. Контрольные варианты характеризовались практически одинаковым уровнем содержания ФЛВ в 4- и 27-м пассажах.

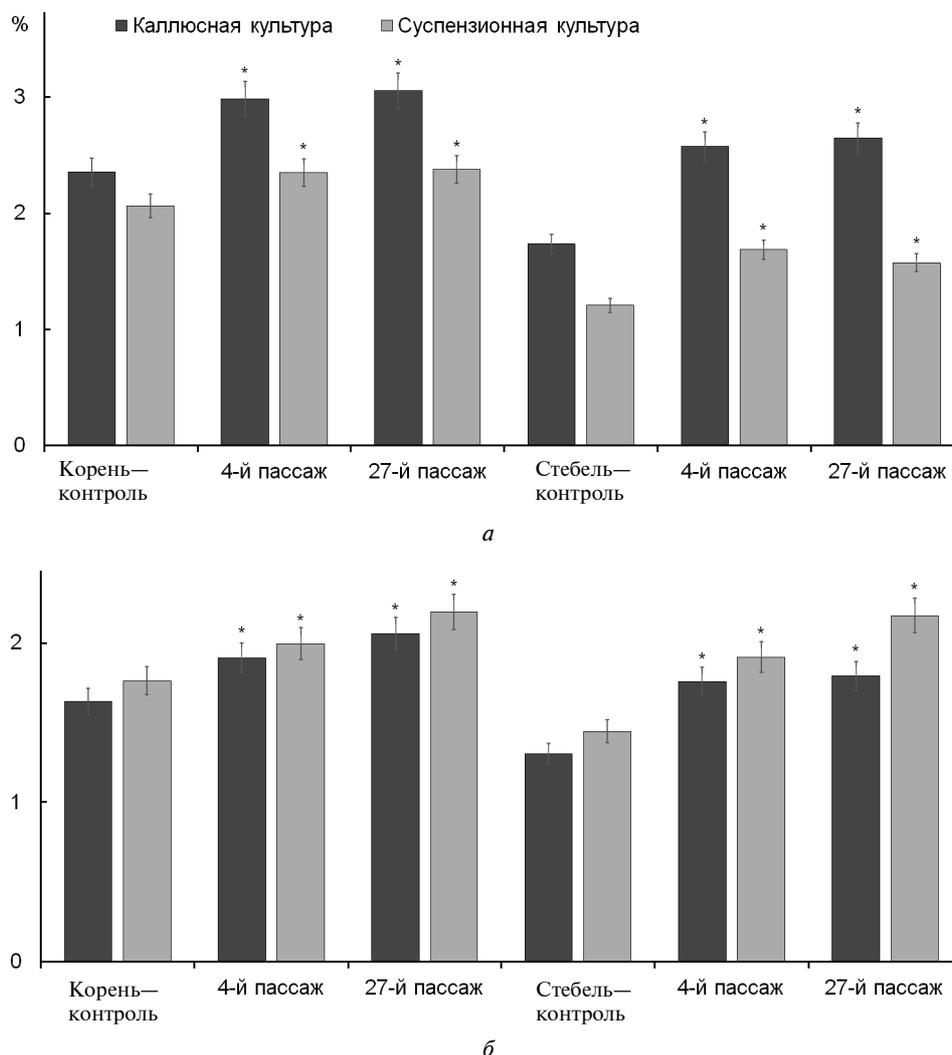


Рис. 2. Суммарное содержание флавонолигнанов в культуре *in vitro* *S. marianum* белоцветкового сортообразца Sibilla (а) и красноцветкового сорта Золушка (б) при воздействии комплексного препарата наночастиц «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в концентрации 0,01 мг/л

В каллюсной культуре белоцветкового сортообразца корневого происхождения при внесении препарата наночастиц металлов содержание целевых БАВ повышалось на 26 и 30 % соответственно в 4- и 27-м пассажах, в то время как в суспензионной культуре данные показатели составили соответственно 14 и 15 %.

Стеблевая культура расторопши белоцветковой расы оказалась более отзывчивой на внесение в культуральную среду препарата «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» — количество ФЛВ увеличилось на 50 % в каллюсной культуре и на 40 % в суспензионной.

У красноцветкового сорта Золушка наблюдалась подобная ситуация: в корневом и стеблевом каллюсах содержание ФЛВ увеличилось соответственно на 20 и 35 % по сравнению с контролем, в корневой и стеблевой суспензионной культуре — на 19 и 40 %.

Таким образом, внесение препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в среду культивирования каллюсов корневого и стеблевого происхождения белоцветкового сортообразца в концентрации 0,01 мг/л обеспечивает наибольшее повышение содержания ФЛВ по сравнению с суспензионной средой, причем максимальное увеличение наблюдалось в стеблевой культуре, в то время как при внесении данного препарата в суспензионную культуру расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка максимально повышалось содержание ФЛВ по сравнению с каллюсной культурой.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что комплексный препарат наночастиц «Наноплант-Со,Мn,Сu,Fe» в концентрации 0,15 мг/л можно использовать как потенциальный стимулятор метаболизма БАВ в каллюсных культурах, в концентрации 0,015 мг/л — в суспензионных культурах *S. marianum* белоцветковой расы, в концентрации 0,01 мг/л — красноцветковой расы.

Изучив имеющиеся данные о ЭМП СВЧ, мы предположили, что такой же стимулирующий эффект ЭМП СВЧ по сходному механизму, как у водорослей и растений открытого грунта [23], может наблюдаться и для нефотосинтезирующих клеток, в частности, для каллюсной и суспензионной культур растений, культивируемых в темноте.

На начальных этапах работы была проведена серия исследований и установлен оптимальный режим ЭМП СВЧ (65—71 ГГц, 20 мин), при котором наблюдалось максимальное повышение содержания БАВ, его и выбрали как опытный [24].

Для опыта были взяты каллюсы 4- и 27-го пассажей. Оценивалось содержание фенольных соединений в каллюсах красно- и белоцветковой рас расторопши, данные представлены в табл. 2.

Так, содержание ФС в 4-м пассаже корневого и листового каллюсов белоцветкового сортообразца увеличивалось на 30 % по сравнению с контролем, а в стеблевом и семядольно-листовом каллюсах — соответственно на 21 и 23 %. Содержание ФС в 27-м пассаже при обработке ЭМП СВЧ в семядольно-листовом каллюсе повышалось на 28 %, в корневом — на 35 %. В листовом и стеблевом каллюсах содержание ФС увеличивалось соответственно на 94 и 76 %. Максимальное содержание вторичных метаболитов определено в листовом каллюсе (на 94 % больше по отношению к контролю) и стеблевом (увеличилось на 76 %).

Тенденция к повышению содержания исследуемых веществ прослеживалась и при обработке каллюсов красноцветкового сорта Золушка. Наибольший отклик отмечен в каллюсах 27-го пассажа. Увеличение содержания ФС наблюдалось в следующей последовательности: наибольшее в стеблевом каллюсе — на 142 %, в листовом на — 99 %, в семядольно-листовом и корневом — соответственно на 72 и 24 %. Каллюсы 4-го пассажа расторопши красноцветковой расы также реагировали на обработку ЭМП СВЧ, но в меньшей степени, чем белоцветковой. Максимальное увеличение наблюдалось в листовом каллюсе (до 135 % по отношению к контролю), в семядольно-листовом и корневом каллюсах исследуемые показатели увеличились до 121 %, а в стеблевой культуре — до 115 %. Следовательно, макси-

МОДИФИКАТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

ТАБЛИЦА 2. Суммарное содержание фенольных соединений (мкг/г) в каллюсах 4- и 27-го пассажей *S. marianum* красно- и белоцветковой рас при воздействии ЭМП СВЧ (65–71 ГГц, 20 мин)

Вариант	4-й пассаж	% контроля	27-й пассаж	% контроля
Красноцветковый сорт Золушка				
Корневые каллюсы				
Контроль	189,560±0,341	100,0	318,940±2,023	100,0
Опыт	*228,380±1,239	120,5	*396,900±1,009	124,4
Стеблевые каллюсы				
Контроль	169,660±2,041	100,0	170,460±2,552	100,0
Опыт	*194,580±1,538	114,7	*411,860±1,797	241,6
Листовые каллюсы				
Контроль	123,880±1,487	100,0	174,440±1,998	100,0
Опыт	*166,920±1,231	134,7	*346,420±2,109	198,6
Семядольно-листовые каллюсы				
Контроль	199,420±1,218	100,0	188,960±2,690	100,0
Опыт	*241,440±1,419	121,1	*325,080±1,657	172,0
Белоцветковый сортообразец Sibilla				
Корневые каллюсы				
Контроль	188,800±0,466	100,0	275,180±1,641	100,0
Опыт	*244,460±1,316	129,5	*372,720±1,111	135,4
Стеблевые каллюсы				
Контроль	172,400±1,206	100,0	185,720±0,669	100,0
Опыт	*208,920±0,737	121,2	*326,420±2,809	175,8
Листовые каллюсы				
Контроль	178,320±0,737	100,0	117,360±1,320	100,0
Опыт	*233,120±0,592	130,7	*227,640±0,707	194,0
Семядольно-листовые каллюсы				
Контроль	168,200±1,564	100,0	177,280±0,592	100,0
Опыт	*206,680±1,506	122,9	*227,20±1,191	128,2

мальное повышение суммарного содержания фенольных соединений в 2,5 раза отмечено в стеблевой культуре, что делает ее более перспективной по сравнению с другими образцами.

Анализ суммарного содержания ФЛВ в каллюсах и суспензионной культуре *S. marianum* (рис. 3) показал, что ЭМП СВЧ оказывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез целевых БАВ. Контрольные варианты характеризовались практически одинаковым уровнем содержания ФЛВ в 4- и 27-м пассажах.

Содержание исследуемых веществ повышалось и при обработке электромагнитным облучением низкого уровня мощности (см. рис. 3). Содержание ФЛВ в корневой культуре 27-го пассажа белоцветкового сортообразца (соответственно каллюсная культура/суспензионная культура) возросло на 40 и 61 %, в стеблевой культуре — на 83 и 172 %, в 4-м пассаже стеблевой культуры — на 40 и 31 %. При обработке ЭМП СВЧ каллюсной и суспензионной корневой культуры 4-го пассажа содержание исследуемой группы БАВ увеличивалось незначительно — на 11 и 8 % по отношению к контролю.

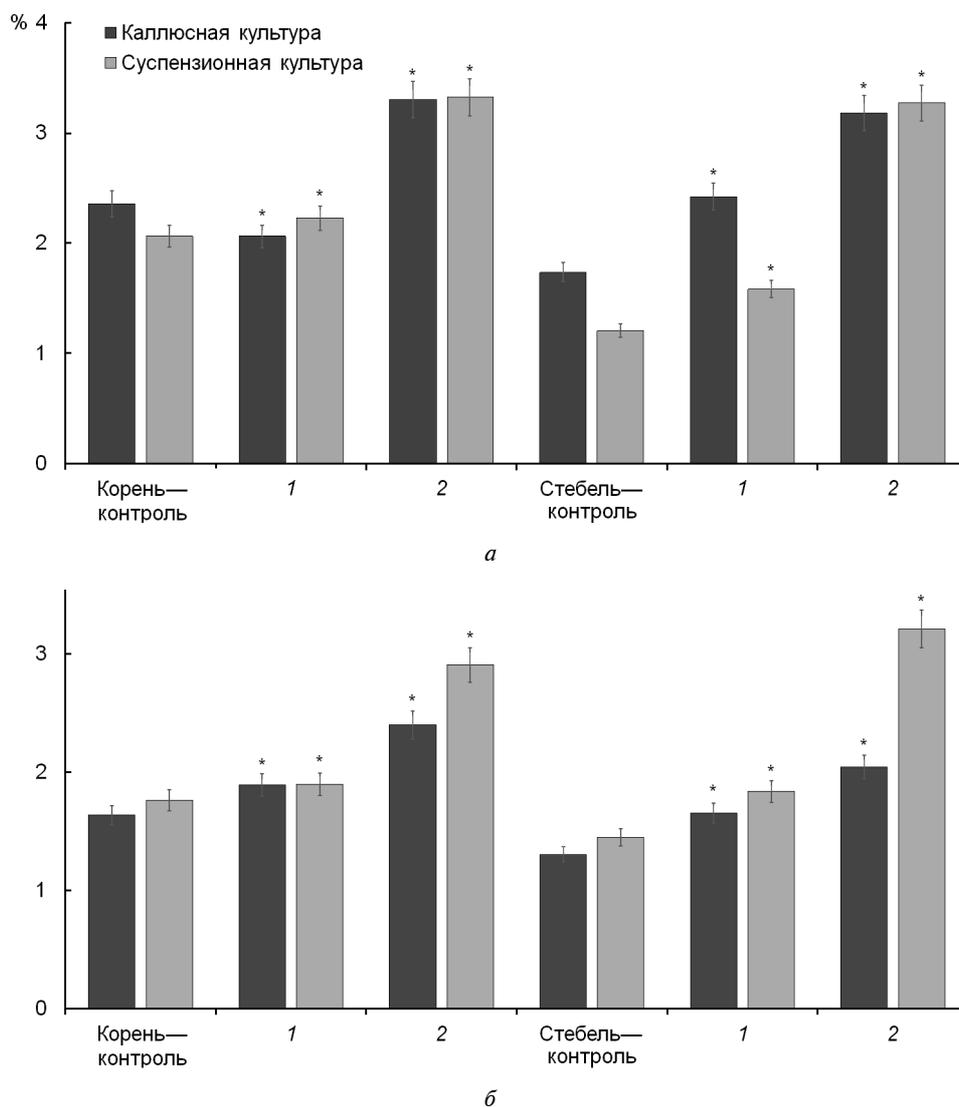


Рис. 3. Суммарное содержание флавонолигнанов в культуре *in vitro* *S. marianum* при воздействии электромагнитного поля сверхвысокой частоты (65–71 ГГц, 20 мин): а — белоцветковый сортобразец Sibilla; б — красноцветковый сорт Золушка; 1, 2 — соответственно 4- и 27-й пассажи

При анализе содержания ФЛВ в культуре *in vitro* красноцветкового сорта Золушка наблюдалась та же тенденция: в стеблевом каллюсе 27-го пассажа содержание увеличивалось на 57 %, в корневом — на 47 %, в стеблевой суспензионной культуре — на 121,5 %, в корневой — на 65 %. При обработке 4-го пассажа содержание ФЛВ по отношению к контролю в корневой каллюсной культуре увеличивалось на 15 %, в стеблевой — на 25 %.

Как видим, ЭМП СВЧ сильнее стимулировало биосинтез вторичных метаболитов в длительнопассируемых культурах. Это, возможно, объясняется тем, что каллюсные клетки в состоянии полной дедифференциации лучше воспринимают внешние электромагнит-

ные сигналы и, как следствие, активизируют биосинтез БАВ [24]. На основе полученных данных разработаны лабораторные регламенты (ЛР) на способ стимулирования биосинтеза БАВ в длительнопассируемых каллюсах *S. marianum* с помощью ЭМП СВЧ (№ ЛР 100233786-001) и с помощью комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со, Мн, Сu, Fe» (№ ЛР 100233786-002).

Таким образом, установлено, что в каллюсах 24- и 27-го пассажей расторопши красно- и белоцветковой рас достоверно возрастает биосинтез ФЛВ после внесения в культуральную среду комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со, Мн, Сu, Fe» в концентрации 0,15 мг/л. Биосинтез БАВ в суспензионной культуре корневого и стеблевого происхождения красноцветкового сорта Золушка стимулировало добавление в среду комплексного препарата в концентрации 0,01 мг/л, а в суспензионной культуре белоцветкового сортообразца Sibilla — 0,015 мг/л. Внесение препарата наночастиц металлов «Наноплант-Со, Мн, Сu, Fe» в каллюсную культуру корневого и стеблевого происхождения белоцветкового сортообразца в концентрации 0,01 мг/л приводило к большему по сравнению с суспензионной культурой повышению содержания ФЛВ. При этом максимальное накопление ФЛВ наблюдалось для стеблевой культуры. Внесение препарата в суспензионную культуру расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка максимально увеличивало содержание ФЛВ по сравнению с каллюсной культурой.

Обработка электромагнитным полем низкого уровня мощности 10 мВт в диапазоне 65–71 ГГц при времени экспозиции 20 мин является оптимальной для каллюсных и суспензионных культур расторопши для повышения содержания вторичных метаболитов. Наиболее отзывчивой оказалась стеблевая культура, для которой идентифицировано максимальное увеличение содержания ФЛВ (242 % по отношению к контролю). Установлено, что длительнопассируемые каллюсы более восприимчивы к обработке ЭМП СВЧ по сравнению с каллюсами 4-го пассажа, в которых увеличение содержания вторичных метаболитов не превышает 20 %. Обработка ЭМП СВЧ длительнопассируемых стеблевых культур приводила к максимальному увеличению содержания ФЛВ: до 57 % в каллюсной культуре и до 121 % в суспензионной. Суспензионная культура более отзывчива к воздействию ЭМП СВЧ, а каллюсная культура — к внесению в культуральную среду комплексного препарата наночастиц «Наноплант-Со, Мн, Сu, Fe».

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 2002. 1, N 1. P. 13–25.
2. Zschocke S., Rabe T., Taylor J.L., Jager A.K., van Staden J. Plant part substitution — a way to conserve endangered medicinal plants? *J. of Ethnopharmacology.* 2000. 71, N 1/2. P. 281–292.
3. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J. of Med. Plants Res.* 2009. 3, N 13. P. 1222–1239.

4. Запрометов М.Н. Вторичный метаболизм в культурах клеток и тканей растений. Культура клеток растений. Москва: Наука, 1981. С. 37–51.
5. Девятков Н.Д., Голант М.В. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн. Москва: ИРЭ РАН, 1994. 245 с.
6. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Лапшин О.М. Изменение фотосинтетической активности микроводорослей под влиянием электромагнитного излучения. *Физиология растений*. 1992. **39**, № 5. С. 21–26.
7. Tambiev A.H., Gusev M.V., Kirikova N.N., Beckiy O.V., Gulaev Y.V. Stimulation of growth of cyanobacteria by millimeter electromagnetic radiation of low intensiveness. Trade exhibition microbe-86: XIX Intern. Congr. microbiol. (Manchester, 7–13 Sept. 1986). Manchester, 1986. P. 96–99.
8. Шаров В.С., Казаринов К.Д., Андреев В.Е., Путвинский А.В., Бецкий О.В. Ускорение перекисного окисления липидов под действием электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. *Биофизика*. 1983. **28**, вып. 1. С. 146–147.
9. Chander R., Karoor N.K., Dhawan B.N. Hepatoprotective activity of silymarin against hepatic damage in *Mastomys natalensis* infected with *Plasmodium berghei*. *Ind. J. of Med. Res.* 1989. **90**. P. 472–477.
10. Jayaram S., Thyagarajan S.P. Inhibition of HBsAg secretion from Alexander cell line by *Phyllanthus amarus*. *Ind. J. of Pathology and Microbiol.* 1996. **39**, Iss. 3. P. 211–215.
11. Юрьев К.Л. Силимарин: эффекты и механизмы действия, клиническая эффективность и безопасность. Ч. I. Эффекты и механизмы действия. *Укр. мед. часопис*. 2010. № 2. С. 71–75.
12. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. US Dep. of Agr., Nat. Agr. Libr. 2017. Mode of access: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>. (Date of access: 13.10.2017).
13. Valenzuela A., Guerra R., Videla L.A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med.* 1986. **52**, Iss. 6. P. 438–440.
14. Кресман В., Скоттова Н., Уалтерова Д., Улричова Ж., Симанек В. Силимарин ингибирует развитие диеты-индуцированной гиперхолестеремии у крыс. *Planta Med.* 1998. **64**, Iss. 2. P. 138–142.
15. Чубарова А.С., Капустин М.А., Спиридович Е.В., Курченко В.П. Содержание флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) различных хеморас. *Вестн. фармациии*. 2012. № 4. С. 28–31.
16. Копач О.В., Кузовкова А.А., Решетников В.Н. Физиолого-биохимические особенности *Silybum marianum* красно- и белоцветковой рас при введении в культуру in vitro и каллусогенезе. *Вестн. НАН Беларуси. Сер. біял. навук*. 2013. № 4. С. 5–10.
17. Государственная фармакопея Республики Беларусь: разработана на основе Европейской Фармакопеи: [в 3 т.]. М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении. Молодечно: Победа, 2009. Т. 3: Контроль качества фармацевтических субстанций: введ. в д. с 22 дек. 2009 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 10.07.09 г., № 691. [под общ. ред. А. А. Шерякова]. 727 с.
18. Луковникова Р.А., Ярош Н.П. Определение витаминов и других биологически активных веществ. Методы биохимического исследования растений. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Луковникова Р.А., Иконникова М.И.; Ермаков А.И. (ред.). Изд. 3-е, перераб. и доп. Ленинград: Агропромиздат, 1987. С. 85–121.
19. Федосеева Г.М., Минович В.М., Горячкина Е.Г., Переломова М.В. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: метод. пособие. Иркут. гос. мед. ун-т Минсоцразвития РФ. Иркутск: [б. и.], 2009. 67 с.
20. Азизбекян С.Г., Домаш В.И., Кучинский М.П. Новые нанопрепараты для растениеводства и ветеринарии. Белорус. нац. техн. ун-т. <http://www.bntu.by/images/stories/News/Forum/Latvia2013/40.pdf>. (Дата доступа: 20.09.17).
21. Азизбекян С.Г., Домаш В.И., Кучинский М.П., Набиуллин А.Р. Новые нанопрепараты для агропромышленного комплекса. *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины*. Материалы V Междунар. науч.-практ. конф. (Ростов-на-Дону, 3–5 окт. 2013). Ростов-на-Дону, 2013. С. 257.

22. Ковзунова О.В. Воздействие наночастиц металлов на биосинтез БАВ в суспензионной культуре *Silybum marianum* L. Ломоносов-2016. Тез. докл. Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 11–15 апр. 2016). Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, Биол. фак. Москва, 2016. С. 350–351.
23. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Лапшин О.М., Смирнов Н.А., Гусев М.В. Стимулирующее действие электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности на рост микроводорослей. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 1990. № 1. С. 32.
24. Копач О.В., Пушкина Н.В. Воздействие электромагнитного поля на биосинтез БАВ в клеточных культурах *Silybum marianum*. *Гидробиология и общая экология*. Тез. докл. XXII Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 13–17 апр. 2015). Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. Москва, 2015. С. 340–341.

Получено 25.07.2019

REFERENCES

1. Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.*, 1, No. 1, pp. 13-25.
2. Zschocke, S., Rabe, T., Taylor, J.L., Jager, A.K. & van Staden, J. (2000). Plant part substitution — a way to conserve endangered medicinal plants? *J. of Ethnopharmacology*, 71, No. 1/2, pp. 281-292.
3. Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J. of Med. Plants Res.*, 3, No. 13, pp. 1222-1239.
4. Zaprometov, M.N. (1981). Secondary metabolism in plant cell and tissue cultures. *Culture of plant cells*. Moscow: Science, pp. 37-51.
5. Devyatkov, N.D. & Golant, M.V. (1994). Features of the medicobiological application of millimeter waves. Moscow: IRE RAS.
6. Tambiev, A.H., Kirikova, N.N. & Lapshin, O.M. (1992). Changes in the photosynthetic activity of microalgae under the influence of electromagnetic radiation. *Plant Physiology*, 39, No. 5, pp. 21-26.
7. Tambiev, A.H., Gusev, M.V., Kirikova, N.N., Beckiy, O.V. & Gulaev, Y.V. (1986, 7–13 Sept.). Stimulation of growth of cyanobacteria by millimeter electromagnetic radiation of low intensiveness. Trade exhibition microbe-86: XIX Intern. Congr. microbiol. (pp. 96-99), Manchester.
8. Sharov, V.S., Kazarinov, K.D., Andreev, V.E., Putvinsky, A.V. & Betsky, O.V. (1983). Acceleration of lipid peroxidation under the action of millimeter-wave electromagnetic radiation. *Biophysics*, 28, No. 1, pp. 146-147.
9. Chander, R., Kapoor, N.K. & Dhawan, B.N. (1989). Hepatoprotective activity of silymarin against hepatic damage in *Mastomys natalensis* infected with *Plasmodium berghei*. *Ind. J. of Med. Res.*, 90, pp. 472-477.
10. Jayaram, S. & Thyagarajan, S.P. (1996). Inhibition of HBsAg secretion from Alexander cell line by *Phyllanthus amarus*. *Ind. J. of Pathology and Microbiol.*, 39, Iss. 3, pp. 211-215.
11. Yuriev, K.L. (2010). Silymarin: effects and mechanisms of action, clinical efficacy and safety. Part I. Effects and mechanisms of action. *Ukr. honey. Hours*, No. 2, pp. 71-75.
12. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. (2017). US Dep. of Agr., Nat. Agr. Libr. Mode of access: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>. (Date of access: 13.10.2017).
13. Valenzuela, A., Guerra, R. & Videla, L.A. (1986). Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med.*, 52, Iss. 6, pp. 438-440.
14. Krecman, V., Skottova, N., Walterova, D., Ulrichova, J. & Simanek, V. (1998). Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.*, 64, Iss. 2, pp. 138-142.

15. Chubarova, A.S., Kapustin, M.A., Spiridovich, E.V. & Kurchenko, V.P. (2012). The content of flavolignans in milk thistle fruits of *Silybum marianum* (L.) of various hemoras. Vestn. pharmacy, No. 4, pp. 28-31.
16. Kopach, O.V., Kuzovkova, A.A. & Reshetnikov, V.N. (2013). Physiological and biochemical characteristics of *Silybum marianum* red and white flowering races when introduced into in vitro culture and callusogenesis. Weight. NAS of Belarus. Ser. byal navuk, No. 4, pp. 5-10.
17. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: developed on the basis of the European Pharmacopoeia: [in 3 tons]. (2009). Ministry of Health Rep. Belarus, Center for Expertise and Testing in Health Care. Molodechno: Victory, 3: Quality control of pharmaceutical substances: introduction. on December 22, 2009 order M-VA Health Rep. Belarus of 10.07.09, No. 691, [under total. ed. A. A. Sheryakov], 727 s.
18. Lukovnikova, R.A. & Yarosh, N.P. (1987). Determination of vitamins and other biologically active substances. Methods of biochemical studies of plants. Ermakov, A.I. (Ed.). 3rd, pererabot. and add. Leningrad, pp. 85-121.
19. Fedoseeva, G.M., Mirovich, V.M., Goryachkina, E.G. & Perelomova, M.V. (2009). Phytochemical analysis of plant materials containing flavonoids: method. Allowance. Irkut. state honey. University of the Ministry of Social Development of the Russian Federation. Irkutsk: [b. and.], 67 p.
20. Azizbekyan, S.G. Domash, V.I. & Kuchinsky, M.P. New nanopreparations for plant growing and veterinary. Belarusian National Technical University. <http://www.bntu.by/images/stories/News/Forum/Latvia2013/40.pdf>. (Access date: 09/20/17).
21. Azizbekyan, S.G., Domash, V.I., Kuchinsky, M.P. & Nabiullin, A.R. (2013, 3–5 October). New nanopreparations for the agro-industrial complex. Proceedings of the V International Scientific Practical. conference Actual problems of biology, nanotechnology and medicine (p. 257), Rostov-on-Don.
22. Kovzunova, O.V. (2016). Effect of nanoparticles of metals on biosynthesis of biologically active substances in suspension culture *Silybum marianum* L. Lomonosov-2016: Proc. report International conf. students, graduate students and young scientists, M.V. Lomonosov Mosc. State Un-ty them., Biol. fact. (pp. 350-351), Moscow.
23. Tambiev, A.Kh., Kirikova, N.N., Lapshin, O.M., Smirnov, N.A. & Gusev, M.V. (1990). The stimulating effect of electromagnetic radiation of the millimeter range of low intensity on the growth of microalgae. Vestn. Mosc. un-ta. Ser. 16, Biology. No. 1, p. 32.
24. Kopach, O.V. & Pushkina, N.V. (2015). The impact of the electromagnetic field on the biosynthesis of biologically active substances in cell cultures of *Silybum marianum*. Hydrobiology and General Ecology: mes. report XXII Intern. conf. students, postgraduates, and young scientists, M.V. Lomonosov Mosc. State Un-ty them. (pp. 340-341), Moscow.

Received 25.07.2019

**МОДИФІКАТОРИ МЕТАБОЛІЗМУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН
КЛІТИННИХ КУЛЬТУР РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ (*SILYBUM MARIANUM* L.)
БІЛОРУСЬКОЇ ТА УГОРСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ**

О.В. Ковзунова, В.Н. Решетников

Державна наукова установа «Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі», Мінськ
e-mail: olga-kopa@mail.ru

Як модифікатори метаболізму біологічно активних речовин (БАР) клітинних культур *Silybum marianum* червоно- і білокріткової рас можна використовувати комплексний препарат наночастинок «Наноплант-Со,Мп,Су,Fe» в концентрації 0,01 мг/л, а також електромагнітне випромінювання надвисокочастотного діапазону хвиль 65–71 ГГц низького рівня потужності 10 мВт за експозиції 20 хв. Тривало культивовані сус-

пенсійні культури чутливіші до електромагнітної обробки, а калюсні культури — до внесення препарату наночастинок металів.

Ключові слова: *Silybum marianum* L., розторопша, культура in vitro, наночастинки металів, електромагнітне поле надвисоких частот, флаволігнани, фенольні сполуки, біологічно активні речовини.

MODIFIERS OF THE METABOLISM OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE CELL CULTURES OF *SILYBUM MARIANUM* L. OF BELARUS AND HUNGARIAN BREEDING

O.V. Kovzunova, V.N. Reshetnikov

The State Scientific Institution «Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus»

2c Surganova St., 220012, Minsk, Republic of Belarus

e-mail: olga-kopa@mail.ru

As modifiers of the metabolism of biologically active substances of the cell cultures of *Silybum marianum* of the red and white flowering races the nanoparticle preparation «Nanoplant-Co,Mn,Cu,Fe» can be used in a concentration of 0.01 mg/l, as well as microwave electromagnetic radiation in the range of 65—71 GHz at a power of 10 mW and exposure time of 20 minutes. Durable suspension cultures are more responsive to electromagnetic treatment, and callus cultures to the preparation of metal nanoparticles.

Key words: *Silybum marianum* L., milk thistle, in vitro culture, metal nanoparticles, microwave radiation, flavolignans, phenolic compounds, biologically active substances.