

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ ИМЕНИ
В.Ф. КУПРЕВИЧА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 582.949.2:[581.19:581.143.6:577.15/19]

МАЗУР
Татьяна Васильевна

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО (*AGASTACHE RUGOSA* (FISCH.
ET S.A. MEY.) KUNTZE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, ЕГО
СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ С ЦЕЛЬЮ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Минск 2023

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель

Решетников Владимир Николаевич, доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты:

Прохоров Валерий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, главный научный сотрудник лаборатории роста и развития растений государственного научного учреждения «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси»

Мазец Жанна Эмануиловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры общей биологии и ботаники учреждения образования «Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка»

Оппонирующая организация

Белорусский государственный университет

Защита состоится «26» сентября 2023 г. в 14:00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д.01.38.01 при государственном научном учреждении «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. E-mail: nan.botany@yandex.by. Телефон: +375 (17) 378-14-69.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Якуба Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «21» августа 2023 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат биологических наук

Е.Я. Куликова

ВВЕДЕНИЕ

Одной из характерных особенностей высших растений является их способность к образованию и накоплению вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологической активности. Несмотря на множество синтетических лекарственных средств, вторичные метаболиты в настоящее время широко используются как в медицине, так и в парфюмерно-косметической промышленности (M. Rashrash, 2017). Запасы большинства лекарственных растений в природе ограничены, а многие из них являются эндемичными (R. Verpoorte, 2002; M. Davey, 2017). Любое растение, используемое в коммерческих целях, становится потенциальным кандидатом на включение в группу видов, находящихся под угрозой исчезновения. Поэтому поиск альтернативного сырья приобретает все большее значение. Исследования по разработке эффективных технологий производства фитохимических лекарственных препаратов и расширению спектра извлекаемых биологически активных веществ (далее БАВ) становятся актуальными (M. Davey, 2017). Клеточные технологии могут решить проблему дефицита сырья и сохранить в природе лекарственные растения. При этом соединения, продуцированные *in vitro*, полностью соответствуют таковым в исходном растении (S.R. Rao, 2002).

Одним из подходов к оздоровлению населения является поиск растений и разработка на их основе профилактических и лекарственных средств. Многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) содержит в значительном количестве целый спектр БАВ, что представляет большой интерес для фармацевтической промышленности. Вторичные метаболиты многоколосника морщинистого обладают антибактериальной, антигрибковой, противовирусной, антимуtagenной, антиоксидантной и гепатопротекторной активностями (K.T. Desta et al., 2015; H. Gong et al., 2017; S. Park et al., 2016; S. Zielińska, A. Matkowski, 2014).

В диссертационной работе использовали несколько путей повышения синтеза вторичных метаболитов в растении – усовершенствование исходных растений, отбор высокопродуктивных клеточных линий, оптимизация сред культивирования, направленная на регуляцию биосинтеза биологически активных веществ в клеточных культурах растений.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Исследования по теме диссертационной работы выполнены в рамках следующих научных программ: ГПОФИ «Ресурсы растительного и

животного мира», тема 37 «Сохранение генофонда редких и хозяйственно ценных видов растений в коллекции *in vitro*. Разработка методов микроклонального размножения и депонирования лекарственных и декоративных культур», на 2006–2010 гг., № гос. регистрации 20065942; НП Республики Беларусь «Инновационные биотехнологии», тема 23 «Разработка способов сохранения генофонда лекарственных и пряно-ароматических растений в составе коллекций *in vitro* и их использования в качестве основы получения суспензионных культур биотехнологического назначения», на 2010–2012 гг., № гос. регистрации 20112016; ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологии», задание 1.15 «Структурные и регуляторные белки клетки и компартментов органелл как показатель физиологического состояния и уровней накопления вторичных метаболитов дедифференцированными тканями лекарственных растений», на 2011–2015 гг., № гос. регистрации 20112019; Грант НАН Беларуси № Б12СО-017 на выполнение научно-исследовательских работ «Разработка новой стратегии в биотехнологии получения вторичных метаболитов в культурах *in vitro* лекарственных растений на основе комбинации методов протеомики и метаболомики» на 2012–2014 гг., № гос. регистрации 20123344.

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., утвержденным указом Президента Республики Беларусь №156 от 07.05.2020 г., пункту 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы».

Цель и задачи исследования

Цель работы – установить физиологические и биохимические характеристики *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze (далее *A. rugosa*) и его соматклонов в культуре *in vitro* как продуцента биологически активных веществ, определить эндо- и экзогенные факторы, обуславливающие повышенное накопление вторичных метаболитов каллусными клетками, с последующей разработкой способов повышения биопродуктивности клеточных культур.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) ввести в культуру *in vitro* *A. rugosa*, определить его ростовые характеристики в зависимости от состава питательных сред;
- 2) изучить морфогенетический потенциал *A. rugosa* и получить соматклоны с повышенным накоплением биологически активных веществ;
- 3) провести биохимический анализ *A. rugosa* и его соматклонов;

4) индуцировать каллусогенез корневых, листовых и стеблевых эксплантов, определить их продуктивность, ростовые и физиолого-биохимические характеристики в зависимости от среды культивирования;

5) определить модификаторы метаболизма и разработать способы направленной регуляции усиленного синтеза биологически активных веществ клеточными культурами *A. rugosa*;

6) получить суспензионную культуру *A. rugosa*, оценить ее продуктивный потенциал.

Объект и предмет исследования

Объекты исследования – многоколосник морщинистый, соматклоны, каллусные и суспензионные культуры.

Предмет исследования – физиолого-биохимическая характеристика *A. rugosa* в культуре *in vitro*, его соматклональная вариабельность с целью биотехнологического использования.

Научная новизна

Впервые в Республике Беларусь получены соматклоны *A. rugosa* и линии каллусных культур в качестве продуцентов биологически активных веществ. Соматклоны и каллусные линии характеризуются повышенным содержанием метаболитов. Экспериментальные образцы каллусов *A. rugosa* послужили основой для получения суспензионных культур, которые могут быть использованы для получения препаратов вторичных метаболитов из биотехнологического сырья. Проведены исследования по направленной регуляции накопления клеточными культурами *A. rugosa* БАВ, включая использование наночастиц селена как модификатора метаболизма, для дальнейшего применения на фармацевтических предприятиях. Клеточные культуры, *A. rugosa* и его соматклоны включены в коллекционный фонд асептических культур государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» и ДНК-банк интродуцентов. Сравнительные физиолого-биохимические показатели *A. rugosa* в культуре *in vitro* и *ex vitro* являются экспериментальной базой для развития работ в области биотехнологии культуры изолированных клеток и тканей лекарственных растений.

Положения, выносимые на защиту

1. Модификация схемы введения в культуру *in vitro* лекарственного растения многоколосника морщинистого увеличила приживаемость и жизнеспособность эксплантов, для микроклонального размножения *A. rugosa* наиболее приемлема среда Мурасиге-Скуга. Добавление в среду культивирования цитокинина 6-бензиламинопурина стимулировало побегообразование у 93,3% листовых и стеблевых эсплантов.

2. Отобранные соматклоны многоколосника морщинистого

характеризуются повышенным содержанием БАВ фенольной природы по сравнению с исходным растением *A. rugosa*. Каллусные линии *A. rugosa* листового, стеблевого и корневого происхождения отличались по интенсивности образования фенольных соединений. Максимальные количества накопления фенольных соединений обнаружены в листовых каллусах соматоклонов *Aga11* и *Aga20*.

3. В качестве модификаторов метаболизма БАВ клеточной культуры *A. rugosa* может быть использован препарат наночастиц селена, который усиливал биосинтез БАВ. Варьирование регуляторами роста в питательной среде культивирования каллусных линий *A. rugosa* приводило к индукции биосинтеза БАВ.

4. Ростовый цикл стеблевой и листовой суспензионных культур *A. rugosa* составляет 16–18 суток. За период субкультивирования плотность суспензионной культуры возрастает в 31,1 раз в стеблевой и в 30,1 раз в листовой суспензионной культуре. Интенсивный синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит в стационарной фазе роста.

Личный вклад соискателя ученой степени

Весь экспериментальный материал получен лично автором или при его непосредственном участии. Планирование и постановка экспериментов, анализ и описание результатов исследований, статистическая обработка данных проведена автором самостоятельно.

Апробация диссертации и информация об использовании её результатов

Результаты исследований, включенные в диссертацию, прошли апробацию на следующих конференциях: XI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ – 2004» (г. Москва, 2004 г.); Международная конференция «Клеточные ядра и пластиды растений: биохимия и биотехнология» (г. Минск, 2004 г.); 6th International Symposium in the Series Recent advances in plant biotechnology from laboratory to business (Cheske Budejovice, Czech Republic, 2005 г.); IX международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (г. Звенигород, 2008 г.); Международная конференция, посвященная 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (г. Минск, 2012 г.); I Международная научная конференция «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы» (г. Новосибирск, 2013 г.); Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений» (г. Минск, 2013 г.); Международная научно-практическая конференция «Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции

растений» (г. Минск, 2014 г.); Международный семинар «Стратегии и методы ботанических садов по сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия природной флоры – VII» (г. Минск, 2021 г.). Материалы диссертации были обсуждены на семинарах отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси».

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, из них 1 монография, 3 статьи в изданиях, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь, 3 статьи в иностранных рецензируемых научных изданиях, 9 статей в сборниках научных трудов и материалов конференций, 5 тезисов докладов. Общий объем опубликованных материалов составляет 3,7 авторских листа (2,2 авторских листа – личный вклад соискателя), в том числе в изданиях, включенных в перечень ВАК – 2,1 авторских листа (личный вклад соискателя – 1,4 авторских листа).

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа включает введение, общую характеристику работы, четыре главы (аналитический обзор литературы, описание объектов и методов исследований, 2 главы результатов исследований и их обсуждение), заключение, список использованных источников и приложения. Работа изложена на 147 страницах печатного текста, содержит 15 таблиц и 36 рисунков. Список использованных источников состоит из 179 источников (140 – на английском, 39 – на русском языке) и списка публикаций соискателя, включающего 21 научную работу.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Обзор литературы

В первой главе представлен анализ литературных данных о ботанико-систематической характеристике, биохимическом составе и фармакологическом действии многоколосника морщинистого. Обсуждаются современные проблемы и способы элиситирования биосинтеза БАВ в клеточных культурах *A. rugosa*.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись многоколосник морщинистый, соматклоны, каллусные и суспензионные культуры.

В работе использованы классические приемы работы с клеточными культурами (Ф.Л. Калинин и др., 1980; Р.Г. Бутенко, 1999). Для оценки ростовой активности клеточных культур рассчитывали удельную скорость роста, индекс скорости роста, экономический коэффициент и продуктивность

(Ф.Л. Калинин и др., 1980; Г.П. Болвелл и др., 1989). Степень агрегированности и жизнеспособность суспензии определяли микроскопически после окрашивания нейтральным красным (Н.А. Егорова, 2001).

Определение суммарного содержания фенольных соединений (M. Wang et al., 2003), содержания суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин в %) (ГФ РБ, 2007), флавонолов (в пересчете на рутин (мг/г)) (Р.А. Луковникова, 1987) и оксикоричных кислот (моль/г) (N. Bauer et al., 2004) проводили спектрофотометрическим методом. Определение содержания акацетина проводили методом ТСХ (ГФ РБ, 2007; А.И. Ермакова, 1987 с нашими модификациями) и ВЭЖХ при использовании стандарта акацетина. ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе Agilent 1100 (США) с диодноматричным детектором. Хроматографию проводили в градиенте вода-ацетонитрил-метанол по методу Merken (Н.М. Merken, 2000). Активность пероксидазы измеряли на основе метода Бояркина (А.И. Бояркин, 1961). Экстракцию растворимых белков проводили по Сафонову с нашими модификациями (В.И. Сафонов, 1971). Содержание белка определяли по Lowry (O.N. Lowry et al. 1951; G.L. Peterson, 1979).

Все анализы проводились в трехкратной повторности, полученные результаты статистически обрабатывались с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2010. Проверку статистической значимости результатов исследования проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа One-Way ANOVA, изменения считали достоверными при $p \leq 0,05$. Все диаграммы построены с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Получение культуры *in vitro* *A. rugosa*

Для стерилизации семян *A. rugosa* использовали четыре стерилизующих соединения (0,1% раствор диацета, 0,1% раствор нитрата серебра, 10% раствор хлорамина, 10% раствор гипохлорита кальция).

Наибольший процент стерильных и жизнеспособных семян был получен при использовании 0,1%-ного раствора нитрата серебра в течение 20 минут. Стерильность семян составила 100%, а всхожесть – 78,3% [2].

С целью подбора состава питательной среды черенки (2,5–3 см) полученной стерильной культуры *A. rugosa* высаживали на следующие питательные среды: Мурасиге-Скуга (МС), Гамборга и Эвелега (В5), $\frac{1}{2}$ МС, $\frac{1}{2}$ В5. Спустя 30 дней культивирования измеряли высоту растений, количество и длину корней, рассчитывали процент укоренившихся растений и оценивали физиологическое состояние растений.

Максимальный процент укоренившихся растений, высота растений, а также количество корней и их длина отмечены на средах с минеральной основой Мурасиге-Скуга. Для дальнейшего размножения *A. rugosa* в культуре *in vitro* была использована среда МС, а для укоренения – среда $\frac{1}{2}$ МС [16, 17, 21].

В результате проведенных исследований получена культура *in vitro* *A. rugosa* (рисунок 1), подобраны условия для микрклонального размножения, наработан материал для изучения морфо- и каллусогенеза в культуре *in vitro*.



Рисунок 1 – Культура *in vitro* *A. rugosa*

Инициация адвентивного побегообразования *A. rugosa* в культуре *in vitro*

Для инициации побегообразования листовые и стеблевые экспланты *A. rugosa* помещали нижней стороной на среды с добавлением цитокининов (6-бензиламинопурина (БАП), кинетина в концентрации 1–4 мг/л) в сочетании с индолилуксусной кислотой (ИУК) в концентрации 0,2 мг/л. Экспланты инкубировали в термостате при температуре 24–25 °С.

Образование адвентивных побегов при добавлении в среду культивирования кинетина отмечено только на стеблевых эксплантах. При добавлении в среду культивирования БАП наблюдали более интенсивное побегообразование. Максимальный процент регенерирующих эксплантов выявлен на среде МС, содержащей 1 мг/л БАП+0,2 мг/л ИУК: у 93,3% листовых и стеблевых эсплантов наблюдали побегообразование. На стеблевых эксплантах среднее количество регенерантов на эксплант составило $5,6 \pm 0,43$ шт., а на листовых – $3,2 \pm 0,3$ шт. Дальнейшее увеличение

концентрации БАП приводило к снижению интенсивности адвентивного побегообразования [3, 9, 18, 19].

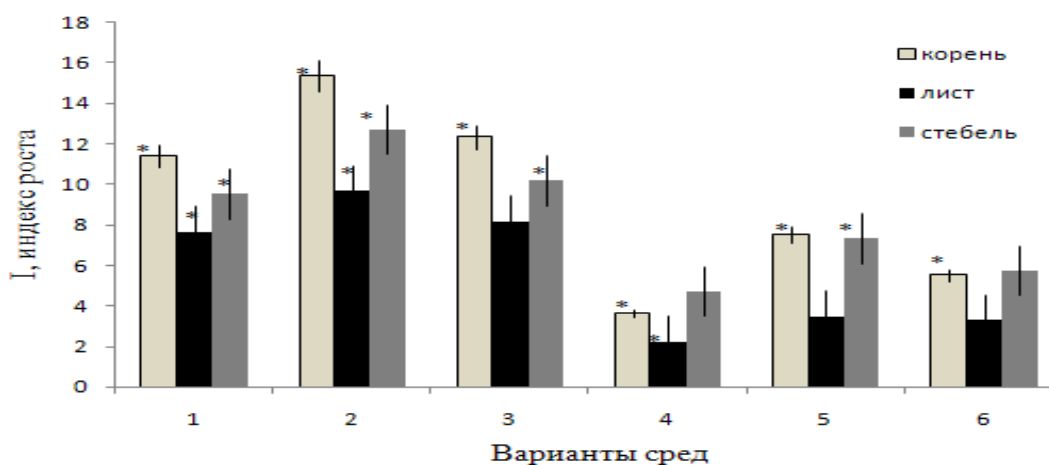
Инициация каллусогенеза, культивирование и характеристика каллусной ткани *A. rugosa* в условиях *in vitro*

Листовые, стеблевые и корневые экспланты-сегменты, взятые с 20-ти дневных растений, помещали на 6 вариантов сред на основе МС с различным соотношением ауксинов и цитокининов. Влияние гормонов на рост и развитие каллусных тканей оценивали с помощью индекса роста (I).

Варианты сред, используемые для индукции каллусогенеза:

- 1) 0,5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП (среда 1);
- 2) 1,0 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП (среда 2);
- 3) 2,0 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП (среда 3);
- 4) 1 мг/л ИУК+0,3 мг/л кинетина (среда 4);
- 5) 2 мг/л ИУК+0,3 мг/л кинетина (среда 5);
- 6) 3 мг/л ИУК+0,3 мг/л кинетина (среда 6).

Максимальный индекс роста эксплантов *A. rugosa* отмечен на среде 2 (1,0 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП) для всех эксплантов (рисунок 2).



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

Рисунок 2 – Индекс роста каллусной ткани *A. rugosa* в зависимости от гормонального состава среды культивирования

Культивирование эксплантов на средах с добавлением ИУК (среды 4–6) вызывало резкое снижение индекса роста по сравнению с другими вариантами сред. Для листовых эксплантов характерны наименьшие показатели индекса роста на всех представленных вариантах сред по сравнению со стеблевыми и корневыми эксплантами.

Оптимальной средой для инициации каллусной ткани *A. rugosa* вне зависимости от происхождения экспланта является среда на основе МС,

содержащая 1,0 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) в сочетании с БАП в концентрации 0,1 мг/л. Продолжительность культивирования каллусов *A. rugosa* в течение первых двух пассажей составляла 30 дней, а последующих пассажей – 18 дней [8, 10]. Листовые и стеблевые каллусы имели светло-кремовый окрас, а корневой каллус немного темнее (рисунок 3). Первичные каллусы имели плотную структуру и сохраняли ее в течение 4-х последующих пассажей.

Максимальный вес всех каллусов во 2-ом пассаже наблюдали на 24 сутки культивирования: 256,3 мг – листовой каллус, 325,5 мг – стеблевой и 301,3 мг – корневой, а максимальный вес всех каллусов в 15-ом пассаже наблюдали на 18 сутки культивирования и составил он у стеблевого каллуса – 3113,4 мг, у листового – 2569,8 мг, у корневого – 2957,5 мг (рисунок 4). На 20 сутки культивирования отмечена фаза деградации – каллусную культуру пассировали на свежую питательную среду [1, 7].



Рисунок 3 – Первичные каллусы *A. rugosa*

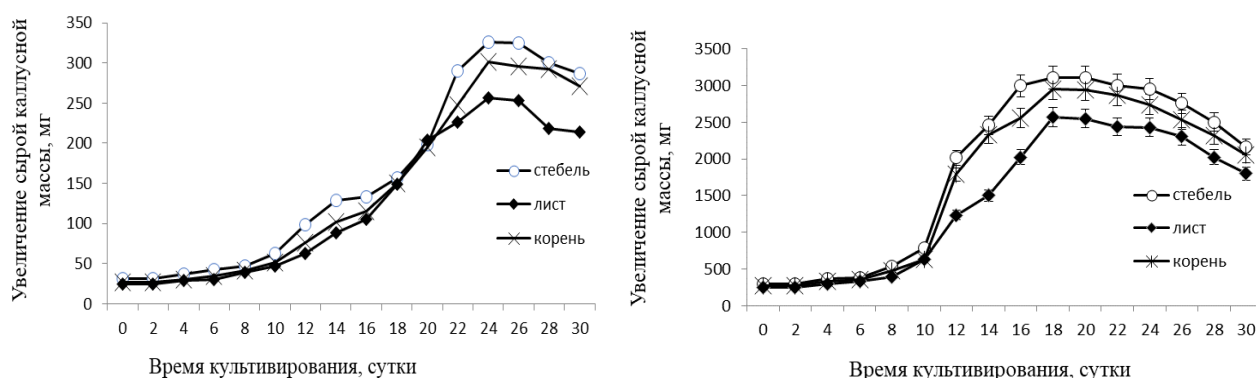


Рисунок 4 – Увеличение сырой каллусной массы *A. rugosa* в течение периода культивирования

Биохимический анализ *A. rugosa* и его соматоклонов

Растения-регенеранты (соматоклоны) *A. rugosa* адаптировали к условиям *ex vitro* с последующей высадкой на экспериментальный участок в Центральном ботаническом саду, где в дальнейшем проходила их вегетация. В фазе цветения в растениях определяли суммарное содержание фенольных соединений (ФС), флавонолов и дубильных веществ, а также количество флавонола акацетина (таблица 1).

Для исследования содержания БАВ фенольной природы было отобрано 7 соматоклонов: *Aga7*, *Aga11*, *Aga17*, *Aga20*, *Aga34*, *Aga36*, *Aga38*. У 6 из 7 исследуемых растений отмечено повышенное содержание фенольных соединений по сравнению с растением *A. rugosa*. Так, в соматоклонах *Aga11* и *Aga20* общее содержание ФС возросло на 66,66 и 42,83%, соответственно, в *Aga34* и *Aga36* – на 26,33 и 21,67%, а *Aga17* и *Aga38* – на 10,66 и 12,50%. Только у соматоклона *Aga7* количество ФС ниже на 4,67%, чем в контрольном образце.

При сравнении полученных данных по количественному содержанию флавонолов, отмечено, что все соматоклоны превосходят исходную форму *A. rugosa*, особенно соматоклоны *Aga11*, *Aga34*, *Aga7* и *Aga20*. У соматоклона *Aga11* количество флавонолов повысилось в 7 раз по отношению к *A. rugosa*, у соматоклона *Aga34* – в 4,5, у *Aga7* – в 3,8, у *Aga20* – в 3,7.

Проанализировав содержание дубильных веществ в экстрактах *A. rugosa*, также было отмечено повышенное содержание во всех исследуемых соматоклонах. Установлено, что максимальное количество дубильных веществ было у соматоклона *Aga20* и составило – $138,0 \pm 0,65$ мг/г сухого вещества, что на 38% выше, чем в исходном растении *A. rugosa*.

Таблица 1 – Суммарное содержание биологически активных веществ фенольной природы в листовых экстрактах *A. rugosa* и соматоклонов

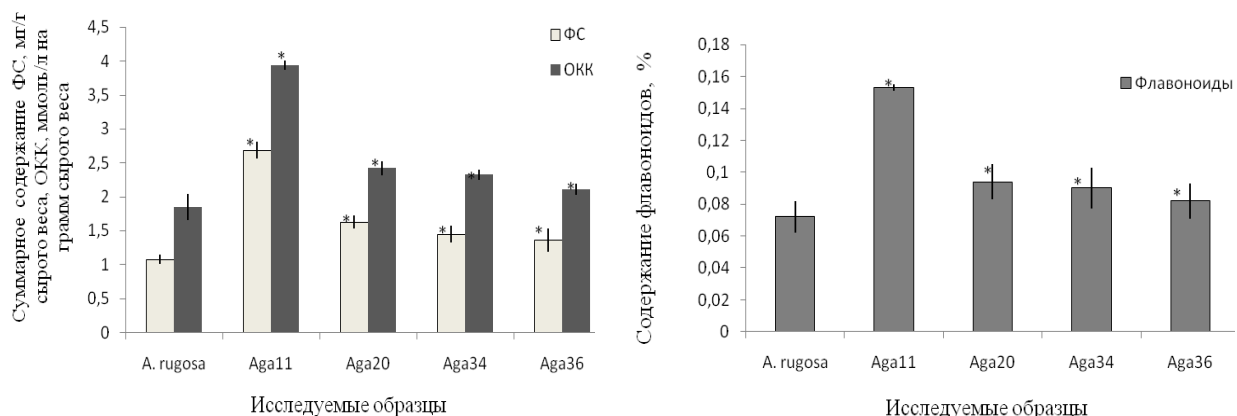
Растение	ФС, мг/г сухого вещества	Флавонолы, мг/г сухого вещества	Дубильные вещества, мг/г сухого вещества	Содержание акацетина, мг/мл
<i>A. rugosa</i>	$60,0 \pm 0,23$	$1,46 \pm 0,21$	$73,0 \pm 0,18$	$1,64 \pm 0,03$
<i>Aga7</i>	$57,22 \pm 0,27^*$	$5,52 \pm 0,13^*$	$103,0 \pm 0,23^*$	$0,81 \pm 0,02^*$
<i>Aga11</i>	$100,0 \pm 0,36^*$	$10,27 \pm 0,33^*$	$106,0 \pm 0,71^*$	$1,09 \pm 0,06^*$
<i>Aga17</i>	$66,41 \pm 0,25^*$	$3,65 \pm 0,16^*$	$108,13 \pm 0,54^*$	$0,96 \pm 0,07^*$
<i>Aga20</i>	$85,73 \pm 0,31^*$	$5,45 \pm 0,29^*$	$138,0 \pm 0,65^*$	$1,74 \pm 0,08$
<i>Aga34</i>	$75,84 \pm 0,19^*$	$6,66 \pm 0,15^*$	$97,03 \pm 0,42^*$	$1,10 \pm 0,01^*$
<i>Aga36</i>	$73,02 \pm 0,43^*$	$3,89 \pm 0,23^*$	–	$1,28 \pm 0,03^*$
<i>Aga38</i>	$67,51 \pm 0,15^*$	$4,27 \pm 0,17^*$	$96,12 \pm 0,43^*$	$0,92 \pm 0,01^*$

Примечание – * обозначает, что различия достоверны по сравнению со значениями контрольного варианта при $p \leq 0,05$

Идентификация акацетина в экстрактах проводилась после кислотного гидролиза экстрактов. При использовании стандарта акацетина методом ВЭЖХ в анализируемых образцах идентифицирован акацетин в свободной и в гликозилированной формах. Однако достоверно значимого увеличения количества акацетина не было отмечено [1, 3, 6]. Соматклоны *A. rugosa* – *Aga11* и *Aga20* являются наиболее интересными и перспективными растениями для фармацевтической промышленности.

Сравнительный метаболомный анализ каллусов *A. rugosa* и его соматклонов

В листовых каллусах *A. rugosa* и соматклонов 3-го пассажа оценено суммарное содержание фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот (ОКК). В листовых каллусах всех соматклонов по сравнению с каллусами *A. rugosa* показано существенное увеличение содержания БАВ (рисунок 5). Максимальное содержание БАВ было обнаружено в листовых каллусах соматклона *Aga11*: суммарное количество ФС по сравнению с исходной формой – 249,12%, ОКК и флавоноидов – 212,5%. В каллусах соматклонов *Aga20*, *Aga34* и *Aga36* повышение количества ФС по отношению к растению *A. rugosa* составило 150,0%, 134,2% и 125,86%, ОКК – 130,53%, 125,0% и 113,92%, флавоноидов – 130,55%, 125,0% и 113,89%, соответственно [1].



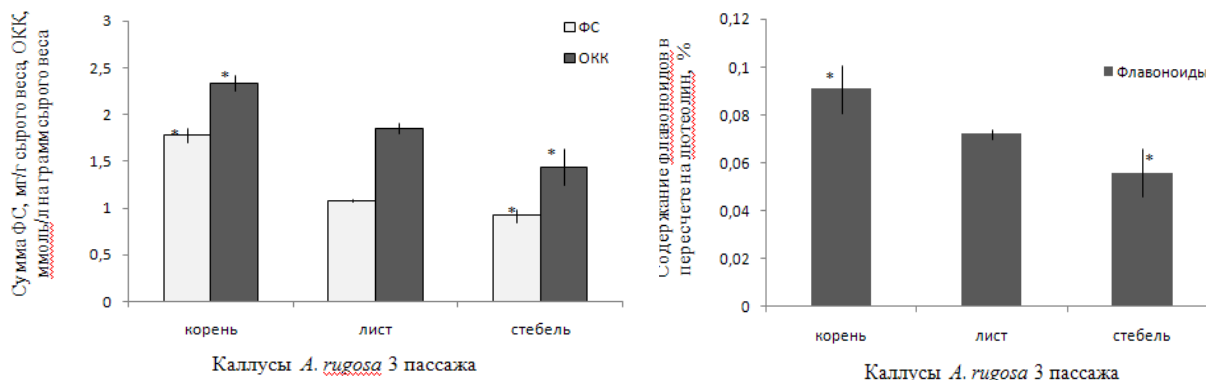
* – различия достоверны по сравнению со значениями контрольного варианта при $p \leq 0,05$

Рисунок 5 – Содержание БАВ в листовых каллусах *A. rugosa* и соматклонов

Среди каллусов *A. rugosa* 3-го пассажа самым продуктивным по накоплению БАВ оказался корневой каллус. Суммарное содержание ФС в корневом каллусе превосходило на 64,96%, по сравнению с листовым каллусом и на 94,53% по сравнению со стеблевым каллусом (рисунок 6).

Количественный анализ флавоноидов и ОКК в корневой каллусной ткани показал, что их количество превосходило на 26,38% и на 26,37%,

соответственно, по сравнению с листовым каллусом, а по сравнению со стеблевым каллусом количество флавоноидов было больше на 62,50%, а ОКК – на 62,48%. Наименьшее содержание БАВ отмечено в стеблевой каллусной ткани [1, 8].



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

Рисунок 6 – Содержание БАВ в каллусах *A. rugosa* разного происхождения

Количественный анализ БАВ каллусов 15-го пассажа *A. rugosa* показал, что самым продуктивным, как и в 3-ем пассаже, оказался корневой каллус: в корневом каллусе по сравнению с листовым каллусом наблюдалось увеличение суммарного содержания ФС на 66,75%, флавоноидов – на 25,9% и ОКК – на 23,93%. Максимальное количество ФС было определено в листовой и корневой каллусной ткани соматоклона *Aga20* – $3,045 \pm 0,466$ и $2,863 \pm 0,107$ мг/г сырого веса, что составило 388,89% и 244,07% от количества в исходной форме, соответственно. Значительное увеличение суммы флавоноидов по сравнению с контрольным вариантом отмечено в листовой каллусной культуре соматоклона *Aga20*, в корневой каллусной культуре соматоклона *Aga11*, в стеблевой каллусной культуре соматоклона *Aga34*. Так, содержание флавоноидов в листовой каллусной культуре соматоклона *Aga20* составило 418,52% по отношению к контролю, в корневой каллусной культуре соматоклона *Aga11* – 251,47%, в стеблевой каллусной культуре соматоклона *Aga34* – 371,43%.

По содержанию ОКК наблюдали аналогичную картину: максимальное содержание суммы ОКК по отношению к контрольному варианту отмечено в листовой каллусной культуре соматоклона *Aga20* (410,96%), в корневой каллусной культуре соматоклона *Aga11* (254,37%), в стеблевой каллусной культуре соматоклона *Aga34* (374,21%) [1, 14].

Практический интерес вызывают результаты по содержанию ОКК в длительнопассируемом листовом каллусе соматоклона *Aga20*, среди которых у *A. rugosa* основу составляет розмариновая кислота (РК). Стабильная

продукция РК каллусными клетками представляет перспективу получения суспензионной культуры с таким же потенциалом. Клеточные культуры *A. rugosa* могут быть альтернативным сырьем для получения РК.

Использование наночастиц селена в качестве индуктора биосинтеза БАВ в каллусных культурах *A. rugosa*

Для усиления биосинтеза вторичных метаболитов в длительно пассируемых каллусных культурах *A. rugosa* (7–14-ый пассажи) использовали препарат наночастиц селена (наноSe), предоставленный институтом физико-органической химии НАН Беларуси, отделом высокомолекулярных соединений, группой механохимии высокомолекулярных соединений под руководством С.Г. Азизбеяна.

Перед пассажем листовых и стеблевых каллусов в среду культивирования МС с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП добавляли 10, 50 и 100 мг/л препарата наноSe. Биологический эффект препарата наноSe оценивали в сравнении с каллусами, пассируемыми на среде МС, содержащей лишь 2,4-Д и БАП (контроль).

Положительный эффект влияния препарата наноSe на рост стеблевой каллусной ткани *A. rugosa* отмечен в концентрации 10 и 50 мг/л. Для стеблевой каллусной ткани максимальный индекс роста отмечен на среде с добавлением наноSe в концентрации 50 мг/л и составил 6,42, в то время как на контрольной среде – 3,79. На рост листовой каллусной ткани добавление препарата наноSe в исследуемых концентрациях не оказывало положительного влияния, а приводило к ингибированию ростовых процессов.

Анализ содержания БАВ в длительно пассируемых каллусных культурах *A. rugosa* (14-ый пассаж) на средах с препаратом наноSe (таблица 2), выявил стимуляцию биосинтеза БАВ в стеблевом каллусе на среде с 50 мг/л наноSe. Так, в данном каллусе содержание флавоноидов увеличилось на 16,67%, а ОКК – на 17,57%.

НаноSe, добавленный в среду культивирования, не оказывал стимулирующего действия на синтез БАВ в каллусных клетках листового происхождения. Таким образом, в листовом каллусе, выращенном на среде с 10 мг/л наноSe произошло снижение флавоноидов на 10,53% и ОКК – на 21,4%, а на среде с 50 мг/л наноSe – на 18,42% и 17,72%, соответственно.

Для выявления перспективной каллусной культуры, обладающей антиоксидантными свойствами, было проведено исследование антиоксидантной активности спиртовых экстрактов листового и стеблевого каллусов, а также оценено действие препарата наноSe на общую антирадикальную активность каллусных клеток *A. rugosa* в модельной системе с катион-радикалами АБТС+• (таблица 3).

Таблица 2 – Содержание БАВ в каллусах *A. rugosa*, культивируемых на средах с добавлением наноSe

Среда культивирования	Содержание флавоноидов, %	% от контроля	Содержание ОКК, ммоль/л на г сыр. веса	% от контроля
Листовой каллус				
МС (контроль)	0,038±0,002	100	1,123±0,007	100
МС+10 мг/л наноSe	0,034±0,005	89,47	1,014±0,005*	90,29
МС+50 мг/л наноSe	0,031±0,003*	81,58	0,924±0,002*	82,28
Стеблевой каллус				
МС (контроль)	0,030±0,001	100	0,888±0,003	100
МС+10 мг/л наноSe	0,024±0,006*	80,0	0,698±0,004*	78,60
МС+50 мг/л наноSe	0,035±0,004*	116,67	1,044±0,001*	117,57

Примечание – * обозначает, что различия достоверны по сравнению со значениями контрольного варианта при $p \leq 0,05$

Исследования показали, что наиболее высокая АРА отмечена в клетках листового каллуса. Препарат наноSe, добавленный в культуральную среду в концентрации 10 мг/л, способствовал повышению уровня общей антиоксидантной активности каллусных клеток *A. rugosa*: стеблевого происхождения на 91,91–92,21%, а листового – на 12,88–28,71%. При этом и в 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).

Таблица 3 – Антиоксидантная активность (по АБТС) в каллусах *A. rugosa*, культивируемых на среде с наноSe

Образец / время реакции	Антиоксидантная активность, ммоль-эквив. тролокса / г ткани			
	1 мин	% от контроля	6 мин	% от контроля
Листовой каллус <i>Agastache rugosa</i>				
МС (контроль)	1,031±0,03	100	1,421±0,08	100
К+10 мг/л наноSe	1,327±0,06*	128,71	1,604±0,09*	112,88
К+50 мг/л наноSe	1,207±0,09*	117,07	1,470±0,08*	103,45
Стеблевой каллус <i>Agastache rugosa</i>				
МС (контроль)	0,593±0,04	100	0,719±0,03	100
МС+10 мг/л наноSe	1,138±0,06*	191,91	1,382±0,03*	192,21
МС+50 мг/л наноSe	0,657±0,08*	110,79	0,943±0,05*	131,15

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

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что повышение уровня антиоксидантной активности клеток связано с реакцией на

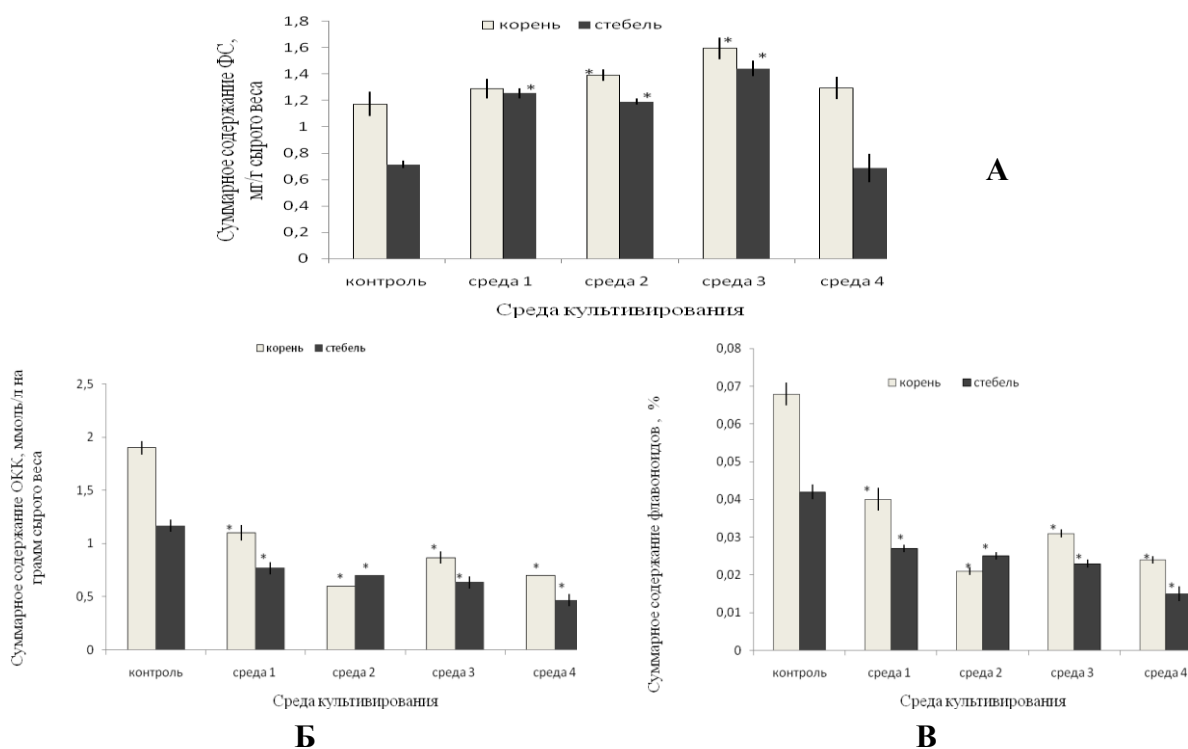
стрессовые условия окружающей среды и, как следствие, с индукцией биосинтеза БАВ, в результате чего можно предположить стимуляцию препаратом наноSe биосинтеза БАВ в каллусных клетках *A. rugosa* [1, 14, 15].

Применение гормонов в качестве модификаторов биосинтеза БАВ в каллусных *in vitro* культурах *A. rugosa*

Варианты сред, используемые как модификаторы биосинтеза БАВ в каллусных *in vitro* культурах *A. rugosa* приведены ниже:

- 1) 1 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП (контроль);
- 2) 0,5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БА (среда 1);
- 3) 0,2 мг/л 2,4-Д+0,3 мг/л НУК+0,2 мг/л БА (среда 2);
- 4) 1 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БА (среда 3);
- 5) 1,5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БА (среда 4).

По результатам исследования было установлено, что замена цитокинина БАП на бензиладенин (БА) в среде культивирования способствовала синтезу ФС клеточными культурами *A. rugosa*. Максимальное количество ФС отмечено на среде **3**, что составило в стеблевой каллусной культуре 201,8%, а в корневой – 135,8% по отношению к контролю (рисунок 7А).



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

Рисунок 7 – Суммарное содержание ФС (А), ОКК (Б), флавоноидов (В) в каллусной ткани *A. rugosa* на различных средах культивирования

Изменение гормонального состава среды культивирования не стимулировало биосинтез флавоноидов и ОКК в корневой и стеблевой каллусной ткани *A. rugosa*. Мы наблюдали обратную картину: уменьшение количества флавоноидов и ОКК (рисунки 7Б и 7В).

Суспензионная культура *A. rugosa*

Суспензионную культуру (СК) *A. rugosa* получали с целью дальнейшего использования при производстве БАВ из клеточной биомассы. В течение цикла выращивания суспензионной культуры определяли следующие параметры: сухую массу, плотность суспензионной культуры, жизнеспособность клеток, содержание фенольных соединений в клетках суспензионной культуры. Полученные результаты представлены на рисунках 8 и 9.

Варианты сред:

1) 0,5 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП; 2) 1,0 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БАП.

На среде с добавлением 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л наблюдали наиболее интенсивное наращивание суспензионной культуры. Так, плотность стеблевой СК в конце культивирования составляла $63,3 \times 10^4$ кл/мл на среде 1, а на среде 2 – $53,7 \times 10^4$ кл/мл. Плотность листовой СК была $57,0 \times 10^4$ кл/мл и $45,2 \times 10^4$ кл/мл, соответственно. Кривые роста по плотности СК совпадают на средах культивирования с добавлением 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л, например латентная фаза длилась четверо суток на среде 1 и на среде 2 (рисунок 8). Дальнейшее культивирование СК *A. rugosa* осуществляли на среде МС, 3% сахарозы с добавлением 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л+0,1 мг/л БАП [5, 20].

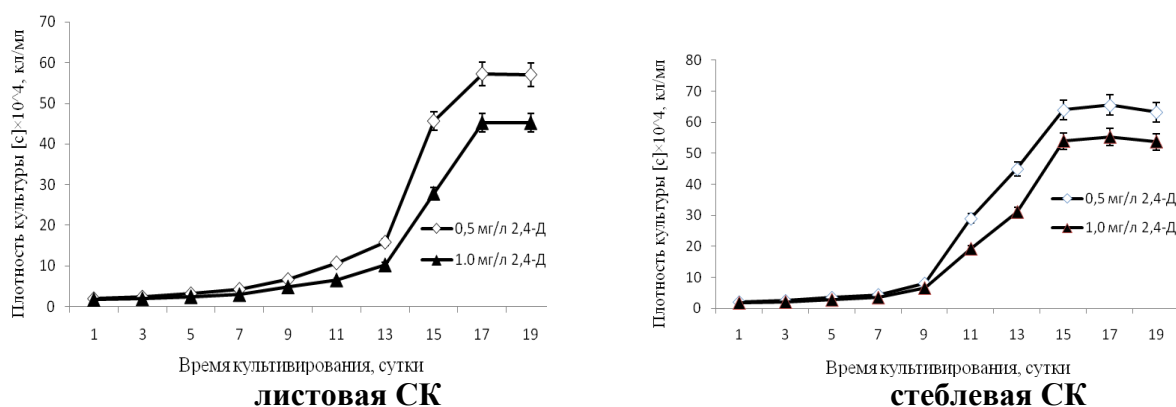


Рисунок 8 – Плотность листовой и стеблевой СК *A. rugosa* в зависимости от среды культивирования

Процент жизнеспособности СК *A. rugosa* колебался от 72,4 до 83,2% для стеблевой культуры и от 76,0 до 86,4% – для листовой культуры. Ростовой цикл полученной культуры составляет 16–18 суток. На 16 сутки

после начала инкубирования наблюдается прекращение прироста сухой массы для стеблевой культуры, а для листовой культуры на 18 сутки.

Латентная фаза у СК *A. rugosa* длилась четверо суток. Затем наступала экспоненциальная фаза роста, где клетки активно делились. После экспоненциальной фазы роста продолжительностью 10 суток, клетки вступали в стадию линейного роста и далее в стационарную фазу. На 19-е сутки начиналась фаза деградации клеток. За период субкультивирования число клеток увеличилось в 31,1 раз в стеблевой и в 30,1 раз в листовой СК.

Для использования СК в биореакторах с целью получения БАВ, важно изучение содержания вторичных метаболитов в течение цикла культивирования для определения времени отбора сырья, на основании максимального содержания БАВ. Для решения данной задачи нами было проанализировано содержание фенольных соединений в суспензионной культуре в течение цикла культивирования (рисунок 9).

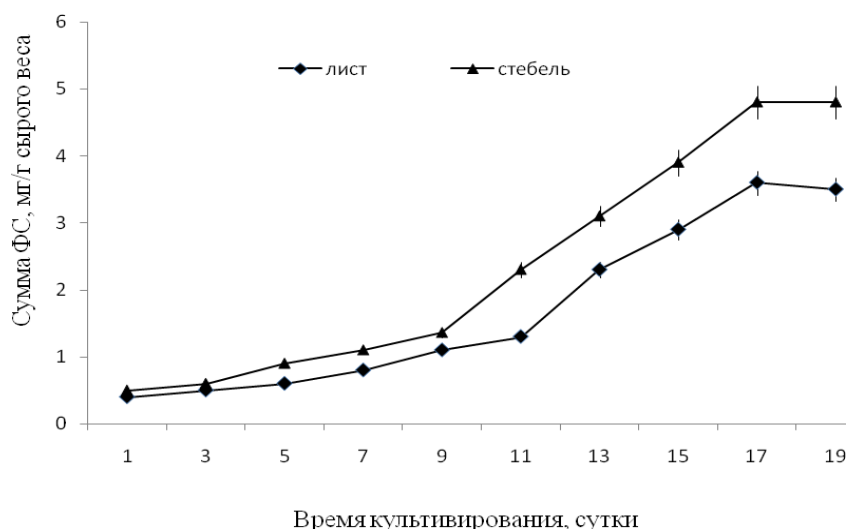


Рисунок 9 – Содержание ФС в клетках СК *A. rugosa* в процессе культивирования

Так, в течение латентной фазы содержание ФС в культурах возрастало незначительно: от 0,5 до 0,9 мг/г в стеблевой и от 0,4 мг до 0,6 мг/г в листовой СК. Затем, в течение 11 суток (период интенсивного роста СК) концентрация ФС в клетках увеличивалась в 4,3 в стеблевой и в 4,8 раза в листовой культуре. На 17 сутки инкубирования СК наблюдали максимальное увеличение внутриклеточного содержания ФС – до 4,8 мг/г (в 5,3 раз) в стеблевой и до 3,6 мг/г (в 6,0 раз) в листовой культуре. Полученные нами результаты, свидетельствуют о том, что синтез ФС в клетках СК *A. rugosa* происходит на всех этапах роста культуры и достигает максимума на 17 сутки. Наиболее интенсивный синтез ФС в клетках СК *A. rugosa* происходит в стационарной фазе роста [1, 4, 5, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработана схема введения в культуру *in vitro* многоколосника морщинистого. Установлено, что стерилизация семян 0,1%-ным раствором нитрата серебра в течение 20 минут в сочетании с замачиванием в дистиллированной воде на 2–3 часа и 10 минутным выдерживанием в перманганате калия с последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой является наиболее эффективным способом. При данном способе стерилизации жизнеспособность семян составила 78,3%, а их стерильность – 100% [2, 17].

2. Разработан метод культивирования многоколосника морщинистого. Среда МС является более эффективной для микроклонального размножения *Agastache rugosa*: максимальный процент укоренившихся растений отмечен на $\frac{1}{2}$ МС среде – 83% и МС среде – 71%. На средах В5 (среда Гамборга и Эвелега) и $\frac{1}{2}$ В5 этот показатель был значительно ниже – 56% и 53%, соответственно. Такие показатели, как высота растений, количество и длина корней, также были выше на средах с минеральной основой Мурасиге–Скуга. На средах В5 и $\frac{1}{2}$ В5 у растений была отмечена витрификация, которая проявлялась в дефиците хлорофилла и нарушении развития побегов: стекловидные, ломкие побеги с прозрачными мелкими листьями и отсутствием верхушечного роста [16, 21].

3. Изучен морфогенетический потенциал многоколосника морщинистого. Выявлено, что процесс адвентивного побегообразования у *A. rugosa* зависит от типа экспланта и соотношения гормонов группы цитокининов и ауксинов. Максимальное адвентивное побегообразование отмечено на среде МС с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л+0,2 мг/л ИУК: у 93,3% листовых и стеблевых эксплантов наблюдали побегообразование. На стеблевых эксплантах среднее количество регенерантов на эксплант составило $5,6 \pm 0,43$ шт., а на листовых $3,2 \pm 0,36$ шт. [3, 9, 18, 19].

4. Впервые получены соматклоны *A. rugosa* и проведён метаболомный анализ *A. rugosa* и его соматклонов. После оценки содержания БАВ были отобраны 4 соматклона-гиперпродуцента БАВ фенольной природы: *Aga20*, *Aga34*, *Aga36*, полученные из стеблевых эксплантов, и *Aga11* – из листового экспланта. В исследуемых соматклонах отмечено повышенное содержание фенольных соединений по сравнению с растением *A. rugosa*: в соматклонах *Aga11* и *Aga20* общее содержание ФС возросло на 66,66% и 42,83%, соответственно, а в *Aga34* и *Aga36* – лишь на 26,33% и 12,50%, соответственно. При сравнении полученных данных по содержанию

флавонолов выявили, что все соматклоны превосходят исходное растение *A. rugosa*: соматклон *Aga11* превосходит контроль в 7 раз, соматклон *Aga34* – в 4,5, *Aga20* – в 3,7, а *Aga36* – в 2,9 раза. Максимальное количество дубильных веществ было отмечено у соматклона *Aga20* и составило – $138,0 \pm 0,65$ мг/г сухого вещества, что на 89,04% выше, чем в интактном растении. Наименьшее количество дубильных веществ содержалось у соматклона *Aga38* – $96,1 \pm 0,43$ мг/г сухого вещества, что выше на 31,64% по отношению к контрольному образцу [1, 3, 6, 13].

5. Получены каллусные культуры корневого, листового и стеблевого происхождения многоколосника морщинистого и его соматклонов. Установлено, что оптимальной средой для индукции каллусообразования на различных эксплантах является среда Мурасиге-Скуга, включающая 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП, для которой были отмечены максимальные значения индекса скорости роста: 16,13 и 18,83 для листового и стеблевого каллусов и 22,71 для корневого каллуса [8, 10].

6. Проведен сравнительный метаболомный анализ каллусов *A. rugosa* и каллусов соматклонов. На начальных этапах культивирования в листовых каллусах всех соматклонов по сравнению с каллусами *A. rugosa* показано существенное увеличение суммарного содержания фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот. Максимальные количества накопленных БАВ обнаружены в листовых каллусах соматклонов *Aga11* и *Aga20*. Так, повышение суммарного содержания фенольных веществ, по сравнению с исходной формой, составило 249,1% и 150,9%, содержание флавоноидов и оксикоричных кислот по отношению к контролю повысилось одинаково – на 112,5% и 30,5%, соответственно. В длительнопассируемых (15-й пассаж) каллусах соматклонов корневого, стеблевого и листового происхождения выявлено, что в них, как и в описанном ранее листовом каллусе 3-го пассажа, сохраняется характерная черта растений-соматклонов, касающаяся повышенного содержания фенольных веществ в целом, а также отдельных классов этих соединений (флавоноидов и оксикоричных кислот). В результате проведенных исследований получены каллусные культуры с усиленным биосинтезом БАВ [1, 14].

7. В каллусах *A. rugosa* стеблевого происхождения на средах, содержащих препарат наноселена, выявлена стимуляция биосинтеза БАВ: на среде с добавлением наноSe в концентрации 50 мг/л содержание флавоноидов увеличилось на 16,67%, а оксикоричных кислот – на 17,57%. НаноSe в концентрации 10 мг/л, добавленный в питательную среду, способствовал повышению уровня общей антиоксидантной активности каллусных клеток *A. rugosa*. Для листового и стеблевого каллуса по отношению к контролю произошло увеличение данного показателя на первой

минуте реакции на 28,71% и 91,91% и на шестой минуте реакции – на 12,88% и 92,22%, соответственно [1, 15]. Установлено, что наночастицы селена увеличили активность пероксидазы в листовом каллусе *A. rugosa*: на среде с добавлением наноселена в концентрации 10 мг/л активность пероксидазы возросла на 24,55% по сравнению с каллусом, выращенным на питательной среде без содержания наноселена [1, 7, 11, 12].

8. Варьирование гормонального состава среды культивирования индуцировало повышение количества БАВ в каллусной культуре *A. rugosa*: замена цитокинина БАП на БА в среде культивирования повлияла на синтез фенольных соединений клеточными культурами *A. rugosa* на всех вариантах сред по сравнению с контролем (среда МС, дополненная 2,4-Д в концентрации 1 мг/л+0,1 мг/л БАП). На среде, содержащей 1 мг/л 2,4-Д +0,1 мг/л БА, в стеблевой каллусной культуре содержание ФС составило 201,8%, а в корневой – 135,8% по отношению к контролю. На среде с содержанием гормонов в концентрации 0,2 мг/л 2,4-Д+0,3 мг/л НУК+0,2 мг/л БА синтез ФС в каллусах был выше по отношению к контролю и составил 118,7% (корневой каллус) и 166,6% (стеблевой каллус). Для корневой и для стеблевой каллусной культуры максимальное содержание ФС было отмечено при культивировании на среде, содержащей 1 мг/л 2,4-Д+0,1 мг/л БА, что составило 1,593 мг/г сырого веса (135,8% по отношению к контролю) и 1,443 мг/г сырого веса (201,8% по отношению к контролю), соответственно [1, 8].

9. Получена суспензионная культура из каллусов стеблевого и листового происхождения многоколосника морщинистого. Установлено, что ростовой цикл культуры на среде МС, дополненной гормонами 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП, составляет 16–18 суток. Синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит на всех этапах роста культуры и достигает максимума на 17 сутки культивирования. За период культивирования количество ФС увеличилось в 5,3 раза в стеблевой СК и в 6,0 раз в листовой СК [4, 5, 20].

Рекомендации по практическому использованию результатов диссертации

Представленные данные служат основой для разработки регламентов получения биологически активных веществ фенольной природы из клеточных культур лекарственного растения многоколосника морщинистого. В ходе выполнения диссертационного исследования разработаны и утверждены лабораторные регламенты на метод культивирования многоколосника морщинистого и на получение суспензионной культуры *A. rugosa*. Их использование позволит получать биотехнологическое сырье

для изготовления иммуномоделирующих препаратов, антисептиков, препаратов для лечения и профилактики заболеваний печени. Подобранные модификаторы метаболизма могут использоваться для регуляции биосинтеза вторичных метаболитов при биотехнологическом производстве, способствуя повышению объема производимой продукции и как следствие снижая расходы. Представленные методические регламенты могут быть применены в аналогичных работах по получению клеточных культур лекарственных растений как продуцентов БАВ.

Многоколосник морщинистый, его соматоклоны и каллусы включены в коллекцию асептических культур хозяйственно полезных растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, которая включена в государственный реестр ботанических коллекций по решению коллегии Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь (свидетельство №29 от 2 августа 2005 г.).

Материалы диссертационного исследования используются в образовательном процессе – работе филиала кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусского государственного университета, созданного при отделе биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», внедрены в учебный процесс студентов факультета естествознания Белорусского государственного педагогического университета имени М. Танка, что подтверждено актами внедрения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Книжные издания

1. Кузовкова А.А., Мазур Т.В., Решетников В.Н. Многоколосник морщинистый: от А до Я. – Минск: А.Н. Вараксин, 2014. – 156 с.

Статьи, в научных изданиях, включенных в перечень изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертаций, и в иностранных научных изданиях

2. Мазур Т.В., Решетников В.Н. Культивирование многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze) *in vitro* // Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2005. – №3. – С. 5–9.

3. Мазур Т.В., Решетников В.Н., Фоменко Т.И. Вторичные метаболиты растений-регенерантов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) // Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2008. – № 4. – С. 5–9.

4. Мазур Т.В. Ростовая и биосинтетическая активность суспензионной культуры *Agastache rugosa* O. Kuntze // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2008. – Вып. 97. – С. 55–59.

5. Мазур Т.В. Суспензионная культура *Agastache rugosa* (Lamiaceae) // Растительные ресурсы. – 2009. – Т. 45, вып. 1. – С. 157–161.

6. Биологические эффекты наночастиц селена и селенита натрия на клеточные культуры многоколосника морщинистого / А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, С.Г. Азизбекян и др. // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов / Киев, 2013. – Т. 12. – С. 260–264.

7. Мазур Т.В. Регуляция ростовых процессов каллусной культуры *Agastache rugosa* O. Kuntze и количественный анализ вторичных метаболитов // Вестник ФФИ. – 2021. – Вып. 1. – С. 42–50.

Статьи в сборниках научных трудов и материалов научных конференций

8. Мазур Т.В., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Сравнительный анализ морфогенетической активности стеблевых и листовых эксплантов многоколосника морщинистого в культуре *in vitro* // Клеточные ядра и пластиды растений: биохимия и биотехнология: Материалы Междунар. конф. / г. Минск, (май 2004 г.). – Минск, 2004. – С. 181–186.

9. Биохимический и молекулярно-генетический анализ многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze) в культуре *in vitro* / Е.В. Спиридович, Т.И. Фоменко, А.Б. Власова, Т.В. Мазур, А.Н. Юхимук // Вестник фармации. – 2012. – №4. – С. 75–87.

10. Регуляция ростовых процессов каллусной культуры представителей семейства *Lamiacea* / Т.В. Мазур, И.Ф. Вайновская, И.М. Чумакова и др. // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: Материалы Междунар. конф., посвященной 80-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси / г. Минск, (июнь 2012 г.). Часть 2. – Минск, 2012. – С. 419–423.

11. Биологическое действие наночастиц селена и селенита натрия на клеточные культуры многоколосника морщинистого / А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, С.Г. Азизбекян и др. // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: Материалы I Междунар. науч. конф. / г. Новосибирск, (май 2013 г.). – Новосибирск, 2013. – С. 69–72.

12. Use of selenium nanoparticles in medicinal plants biotechnology / A.A. Kuzovkova, T.V. Mazur, S.G. Azizbekian et al. // Biologically active substances of plants – studying and application: Proceeding of the International Scientific Conference dedicated to the 55th anniversary of the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus and to the 75th anniversary of the academician of the NAS of Belarus / Minsk, (may 2013). – Minsk, 2013. – P. 266–267.

13. Use of proteomic and metabolomic methods in medicinal plants biotechnology / A.A. Kuzovkova, T.V. Mazur, T.I. Novikova et al. // Biologically active substances of plants – studying and application: Proceeding of the International Scientific Conference dedicated to the 55th anniversary of the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus and to the 75th anniversary of the academician of the NAS of Belarus / Minsk, (may 2013). – Minsk, 2013. – P. 140–141.

14. Анализ содержания биологически активных веществ в длительнопассируемых каллусах от эксплантов исходной формы и соматоклонов *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze / А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, В.Н. Решетников и др. // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: Сб. материалов Междунар. науч. конф. / г. Минск, (август 2014 г.). Часть 2. – Минск, 2014. – С. 143–146.

15. Использование препарата наночастиц селена в качестве стимулятора синтеза биологически активных в длительнопассируемых каллусах *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze / А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, А.М. Деева и др. // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: Сб. материалов Междунар. науч. конф. / г. Минск, (август 2014 г.). Часть 3. – Минск, 2014. – С. 147–150.

16. Мазур Т.В. Micropropagation of *Agastache rugosa* as a promising source of biologically active substances // Current problems of plant physiology

and genetics: proceeding of the International Scientific Conference, dedicated to the 75th anniversary of the Institute of Plant Physiology and Genetics of the NAS of Ukraine / Kyiv, (June 2021). – Kyiv, 2021. – P. 305–307.

Тезисы докладов

17. Мазур Т.В., Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г. Микроклональное размножение многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa*) // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Тез. докл. III Междунар. науч. конф., г. Минск, (октябрь 2003 г.) / Минск, 2003. – С. 78.

18. Мазур Т.В. Морфогенез многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa*) в культуре *in vitro* // Ломоносов – 2004: Тез. докл. XI Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Москва, (апрель 2004г.) / М., 2004. – С. 97.

19. Mazur T., Berdichevets L. Morphogenic activity of *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) in culture *in vitro* // From laboratory to business: Book of abstracts 6th International Symposium in the Series Recent advances in plant biotechnology, Cheske Budejovice, Czech Republic, (September 2005) / Cheske Budejovice, 2005. – P. 121.

20. Мазур Т.В. Биосинтетическая и ростовая активность суспензии клеток *Agastache rugosa* O. Kuntze // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Тез. докл. IX междунар. конф., г. Звенигород, (сентябрь 2008 г.) / М., 2008. – С. 234–235.

21. Мазур Т.В., Фоменко Т.И. Клеточные технологии при культивировании лекарственных растений семейства *Laminaceae* // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы VI междунар. науч. конф., г. Минск, (октябрь 2009 г.) / Минск, 2009. – С. 99.

РЭЗІЮМЭ

Мазур Таццяна Васільеўна

**Фізіёлага-біяхімічная характарыстыка мнагакалосніка
маршчыністага (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) у культуры
in vitro, яго самакланальная варыябельнасць з мэтай біятэхналагічнага
выкарыстання**

Ключавыя словы: *Agastache rugosa*, калусная культура, суспензійная культура, *in vitro*, самаклоны, фенольныя злучэнні, оксікорычныя кіслоты, флаваноіды, флаванолы, антыаксідантная актыўнасць

Мэта даследавання: ўсталяваць фізіялагічныя і біяхімічныя характарыстыкі *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze і яго самаклонаў у культуры *in vitro* як прадукцэнта біялагічна актыўных рэчываў, вызначыць энда- і экзагенныя фактары, якія абумоўліваюць павышанае назапашванне другасных метабалітаў калуснымі клеткамі з наступнай распрацоўкай спосабаў павышэння біяпрадуктыўнасці клеткавых культур.

Метады даследавання: культываванне клетак і тканак раслін, экстракцыя, спектрафотаметрыя, тонкапластовая храматаграфія, высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню ў Рэспубліцы Беларусь атрыманы самаклоны *A. rugosa* і лініі калусных культур у якасці прадукцэнтаў біялагічна актыўных рэчываў. Самаклоны і калусныя лініі характарызуюцца павышаным утрыманнем БАР. Атрымана суспензійная культура, якая можа быць выкарыстана ў біярэактары для атрымання прэпаратаў біялагічна актыўных рэчываў. Падабраны мадыфікатары метабалізму па накіраванай рэгуляцыі назапашвання клеткавымі культурамі *A. rugosa* біялагічна актыўных рэчываў, уключаючы выкарыстанне наначасціц селену.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі і распрацаваныя лабараторныя рэгламенты могуць быць выкарыстаны ў біятэхналагічных лабараторыях і прадпрыемствах, якія спецыялізуюцца на распрацоўцы і атрыманні прэпаратаў з клеткавых культур.

Вобласць выкарыстання: фізіялогія раслін, біяхімія, біятэхналогія, фармакагнозія.

РЕЗЮМЕ

Мазур Татьяна Васильевна

Физиолого-биохимическая характеристика многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) в культуре *in vitro*, его соматональная вариабельность с целью биотехнологического использования

Ключевые слова: *Agastache rugosa*, каллусная культура, суспензионная культура, соматоналы, фенольные соединения, флавоноиды, флавонолы, оксикоричные кислоты, антиоксидантная активность

Цель исследования: установить физиологические и биохимические характеристики *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze и его соматоналов в культуре *in vitro* как продуцента биологически активных веществ, определить эндо- и экзогенные факторы, обуславливающие повышенное накопление вторичных метаболитов каллусными клетками с последующей разработкой способов повышения биопродуктивности клеточных культур.

Методы исследования: культивирование клеток и тканей растений, экстракция, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Полученные результаты и их новизна: впервые в Республике Беларусь получены соматоналы *A. rugosa* и линии каллусных культур в качестве продуцентов биологически активных веществ. Соматоналы и каллусные линии характеризуются повышенным содержанием БАВ. Получена суспензионная культура, которая может быть использована в биореакторах для получения препаратов БАВ. Подобраны модификаторы метаболизма по направленной регуляции накопления клеточными культурами *A. rugosa* биологически активных веществ, включая использование наночастиц селена.

Рекомендации по использованию: полученные результаты и разработанные лабораторные регламенты могут быть использованы в биотехнологических лабораториях и предприятиях, специализирующихся на разработке и получении препаратов из клеточных культур.

Область применения: физиология растений, биохимия, биотехнология, фармакогнозия.

SUMMARY

Mazur Tatsiana

Physiological and biochemical characteristics of *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze *in vitro* culture, its somaclonal variability for the purpose of biotechnological use

Key words: *Agastache rugosa*, callus culture, suspension culture, somaclones, phenolic compounds, flavonoids, flavonols, oxycoric acids, antioxidant activity

Aim of the work: to establish the physiological and biochemical characteristics of *Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze and its somaclones in culture *in vitro* as a producer of biologically active substances, to determine endo- and exogenous factors that cause increased accumulation of secondary metabolites by callus cells and to develop ways to increase the bioproductivity of cell cultures.

Research methods: cultivation of plant cells and tissues, extraction, spectrophotometry, thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography.

Obtained results and their novelty: for the first time in Republic of Belarus were obtained the somaclones of *A. rugosa* and the callus culture lines as producers of biologically active substances. The somaclones and callus lines are characterized by an increased content of biologically active substances. The suspension culture, which can be used in bioreactors to produce BAS preparations, has been obtained. Have been selected metabolism modifiers for the directed regulation of the accumulation of biologically active substances by *A. rugosa* cell cultures including the use of selenium nanoparticles.

Recommendations for use: the obtained results and developed laboratory regulations can be used in biotechnological laboratories and the enterprises specializing on elaboration and manufacturing of preparations from cell cultures.

Applications: plant physiology, biochemistry, biotechnology, pharmacognosy.



ЛИСТ ИСПРАВЛЕНИЙ

в текст автореферата диссертации Татьяны Васильевны Мазур «Физиолого-биохимическая характеристика многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) в культуре *in vitro*, его соматоклональная вариабельность с целью биотехнологического использования», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Страницы автореферата	
В ссылаках на основные научные результаты диссертации написано	Следует читать
С.18, научный результат 2	
[16, 21]	[2, 16, 21]
С.19, научный результат 4	
[1, 3, 6, 13]	[1, 3, 9, 13]
С.19, научный результат 5	
[8, 10]	[7, 10]
С.20, научный результат 7	
[1, 7, 11, 12]	[1, 6, 11, 12]
С.20, научный результат 8	
[1, 8]	[1, 7]

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.38.01,
к.б.н., доцент



Е.Я. Куликова

Соискатель



Т.В. Мазур