

10. Патент РФ № 2460780 Продукт полисахарида. / Г.Г. Худайгулов, Г.Э. Актуганов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, Н.Н. Силищев / Оpubл. 2012.
11. Рафикова, Г.Ф. Эффективность кормовой добавки Бациспецин БМ при выращивании молодняка гусей и свиней / Г.Ф. Рафикова, М.Д. Бакаева, Е.В. Логинова [и др.] // Зоотехния. – 2017. – № 7. – С. 22-26.
12. Федорова, П.Ю. Биотехнология получения циклодекстриновополифракционного состава на основе продуцента *Raenibacillusehimensis* IB-739 : Автореф. дисс... канд. биол. наук. – Уфа, 2012. – 23 с.
13. Федорова, П.Ю. Бактерии *Raenibacillusehimensis* – новый источник циклодекстринглюканотрансфераз / П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев // В сб. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – М.: ВНИИПБТ, 2012. – С. 49-52.
14. Худайгулов, Г.Г. Экзополисахаридальгинатного типа *Raenibacillus ehimensis* 739 / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.– 2011. – Т.13, №5(3). – С. 214–217.
15. Широков, А.В. Белковые и пептидные факторы *Bacillus* sp.739 - ингибиторы роста фитопатогенных грибов / А.В. Широков, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т.38, № 2. – С. 161-165.

LED-ОСВЕЩЕНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ БИОСИНТЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Молчан О.В.¹, Петринчик В.О.¹, Запрудская Е.В.¹,

Шабуня П.С.², Фатыхова С.А.², Лешина Л.Г.³, Булко О.В.³

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь, olga_molchan@mail.ru

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

*Установлен спектральный состав и интенсивность света, стимулирующего накопление биомассы и биосинтез фармакологически ценных вторичных метаболитов в *Catharanthus roseus* G.Don. Определены основные требования к LED-освещению при выращивании *C. roseus* и получении лекарственного сырья с повышенным содержанием фармакологически ценных противоопухолевых терпеновых индольных алкалоидов винбластин и винкристина, а также аймалицина – алкалоида с гипотензивной активностью. Изучена регуляция физиолого-биохимических*

параметров микроклонально размноженных растений-регенерантов *Digitalis purpurea* L., *Aervalanata* L и *C. roseus* in vitro с помощью различных режимов LED-излучения.

Введение. В условиях, когда необходимо постоянно увеличивать долю лекарственных субстанций отечественного производства, представляется важным развивать подходы к созданию сырьевой базы лекарственных растений. Поэтому сегодня особое значение имеет разработка и внедрение современных технологий, позволяющих получать на основе биомассы культивируемых растений сырье, содержащее необходимые фармакологически активные вещества в достаточном количестве независимо от климатических условий. Одной из таких технологий является культивирование растений с использованием светодиодного (LED (Light Emission Diodes) излучения. Малая ширина спектра излучения полупроводниковых светодиодов является фактором, позволяющим использовать энергосберегающее освещение с оптимальным для конкретного вида растений спектральным составом, а также регулировать плотность потока фотонов (ППФ) и продолжительность излучения в пределах каждой спектральной составляющей.

Одним из наиболее фармакологически ценных растений является *C. roseus*, содержащий около 150 индольных алкалоидов, среди которых - соединения, обладающие противоопухолевой (винбластин, винкристин), гипотензивной (аймалицин, серпентин), диуретической (катарантин, виндолин) активностью [1]. Димерные алкалоиды винбластин и винкристин до сих пор не получены химическим синтезом, их выделяют только из растительного сырья, либо экстрагируют из растений предшественники – мономеры – катарантин и виндолин и используют их для синтеза димеров. Применяют при химиотерапии лимфогранулематоза, гематосарком и других онкологических заболеваниях. Содержание этих алкалоидов в растении крайне мало и варьирует в пределах 0,001-0,0001 %, стоимость достигает млн.\$/кг.

Aervalanata L. (эрва шерстистая), на родине двухлетняя трава, используется как антигельминтное и диуретическое средство, а корни - при лечении головных болей, в терапии заболеваний почек, мочевого пузыря, печени и ряда других заболеваний. Трава эрвы шерстистой содержит индольные алкалоиды, фенольные кислоты, флавоноиды и др.

Digitalis purpurea L. (наперстянка пурпурная) Надземная часть растения содержит стероидные гликозиды (дигитоксин, β-ацетилдигитоксин, дигитонин, гитоксин, гитонин), а также ряд органических кислот, сапонины, флавоноиды, холин и другие соединения.

В условиях восточно-европейского климата сырье данных видов растений не заготавливают и необходимые лекарственные препараты ввозят исключительно из-за рубежа. Следует также отметить, что изучение

регуляции биосинтеза фармакологически ценных вторичных метаболитов, а также роста и развития лекарственных растений *in vivo* и *in vitro* с помощью различных режимов LED-излучения является сегодня одним из перспективных направлений исследований. При этом число работ, посвященных влиянию света различного спектрального состава на растения и культуры *in vitro* крайне ограничено. В основном, проводили сравнительный анализ биосинтетических процессов в клетках гетеротрофных и фотомиксотрофных (на белом свете с использованием люминесцентных ламп) каллусных и суспензионных культур. При этом разными группами авторов получены весьма противоречивые данные [1, 2]. Только в последние несколько лет появилась возможность использовать в работах сверхъяркие светодиоды, позволяющие получать световой поток высокой интенсивности, необходимый для длительного культивирования растений при определенных режимах освещения [3-5]. Поэтому к настоящему времени очень мало информации о реакции лекарственных растений в т.ч. *C. roseus*, на LED-освещение [3-5]. При этом в литературе отсутствуют сведения об оптимальных режимах LED-освещения для активации биосинтеза ТИА и накопления винбластина и винкристина.

Целью данной работы было изучение влияния различных режимов LED-освещения на биосинтез вторичных метаболитов и физиолого-биохимические параметры растений при длительном культивировании в условиях закрытого грунта. Основные направления работы украинской стороны в данном проекте были связаны с изучением влияния LED-освещения на микроклонально-размноженные растения-регенеранты *in vitro*.

Материалы и методы. Растения *C. roseus* культивировали при люминесцентном (контроль) и LED-освещении различного спектрального состава и интенсивности, с фотопериодом – 16/8 часов (свет/темнота). Были использованы три специализированные системы LED-освещения с определенными спектральными характеристиками, изготовленные в Центре светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси. Конструкция систем позволяла обеспечить освещение с соотношением квантов синего (С) и красного (К) света С/К – 1/1,3; 1/2,5 или 1/4 и ППФ– 200 либо 500 мкмоль квантов*м⁻² *с⁻¹ на уровне верхней точки роста растений. Таким образом, было организовано 6 вариантов LED-освещения растений (LED 1-6). Высушенную до абсолютно сухой массы растительную ткань измельчали до состояния пудры и использовали для экстракции вторичных метаболитов. Определение аймалицина, виндолина, катарантина, винбластина и винкристина проводили методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 и тандемного масс-спектрометра Agilent 6410 TripleQuard. Содержание фенольных соединений и фотосинтетических пигментов, активность антиоксидантных ферментов определяли общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение. Проиллюстрировать возможности применения светодиодов для направленного синтеза вторичных метаболитов можно на примере растений *C. roseus*. В результате проведенных исследований были установлены спектры и уровни плотности потока фотонов LED-освещения, оптимальные для ростовых процессов, а также синтеза и накопления алкалоидов. Так, например, определены режимы освещения, приводящие к увеличению высоты растений, площади венчика и интенсивности цветения. Накопление сухой массы листьев стимулировало LED-освещение с повышенным содержанием красного света в спектре излучения (рисунок 1А). Для образования корневой системы наиболее эффективными были варианты освещения с высоким уровнем ППФ (рисунок 1Б). Максимальным суммарным накоплением сухой массы характеризовались растения при высоком уровне ППФ и, особенно, с высоким соотношением в спектре красного света к синему.

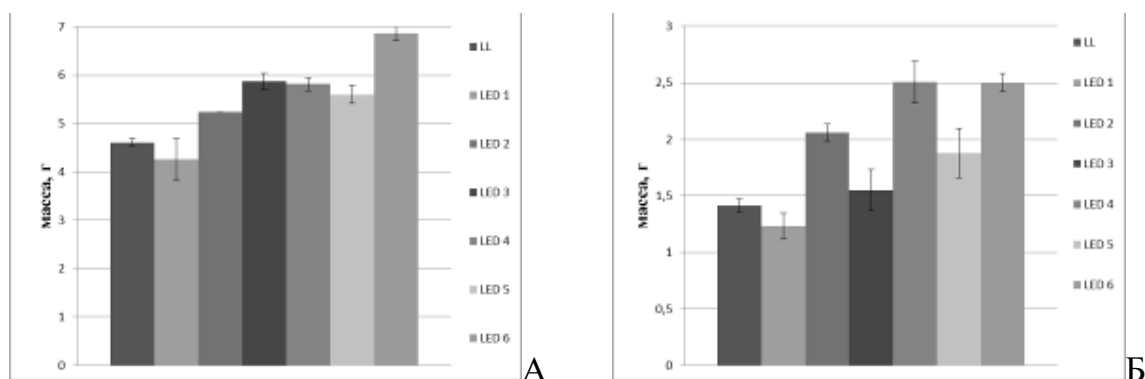


Рисунок 1 - Влияние различных типов освещения на сухую массу листьев (А), корневой системы (Б) *C.roseus*

Согласно хорошо известной схеме биосинтеза терпеновых индольных алкалоидов *C.roseus* в клетках растения функционируют два основных пути их образования из общего предшественника (рисунок 2). Первый – цепочка биосинтеза аймалицина и серпентина. Второй – путь биосинтеза мономерных алкалоидов катарантина и виндолина, их димеризация с образованием винбластина и винкрестина.

Нами были определены режимы LED-излучения, стимулирующие некоторые ключевые ферменты биосинтеза и, таким образом, цепочку биосинтетических процессов, приводящих к образованию аймалицина или димерных индольных алкалоидов. Исследования содержания алкалоидов подтвердили, что режим LED 3 стимулирует синтез и накопление виндолина, катарантина и винбластина, а режим LED 6 – аймалицина.

Можно заключить, таким образом, что представляется возможным культивирование растений *C. roseus* в условиях LED-освещения для получения высокоценных ТИА. А специализированные системы LED-освещения целесообразно использовать для проведения исследований по

регулируемому биосинтезу первичных и вторичных метаболитов хозяйственно ценных растений в закрытом грунте.

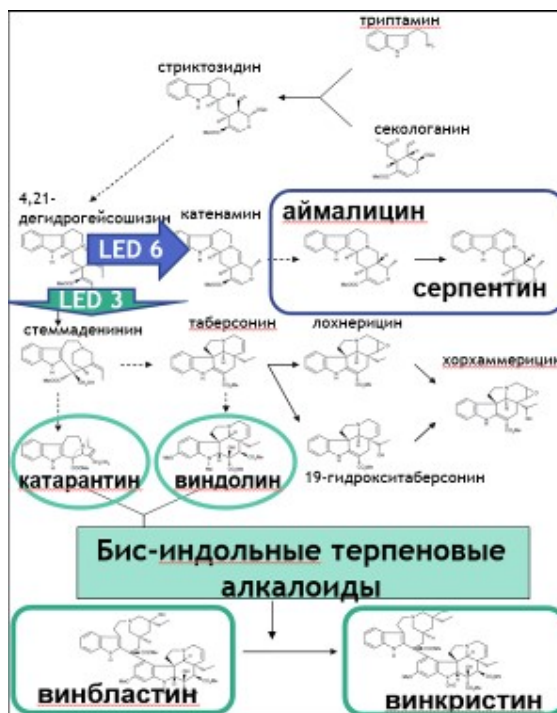


Рисунок 2 – Упрощенная схема биосинтеза ТИА *Catharanthus roseus* G. Don.

Сравнивая результаты, полученные при культивировании трех видов микроклонально размноженных растений *Digitalis purpurea* L. (трансформант *A. rhizogenes* (штамм 15834)), *A. rhizogenes* и *C. roseus* при LED-освещении тремя комбинациями длин волн (К/С - 1,3/1; 2,3/1; 4/1) установили корреляционную связь ряда исследуемых показателей. Показано, что количество каротиноидов имеет обратную зависимость с отношением суммы хлорофиллов к каротиноидам. В растениях, где повышено содержание каротиноидов, обнаруживаются высокие показатели активности СОД. А у растений с высокими показателями- усилено побегообразование. Важным результатом оказалось обнаружение различий в конститутивном уровне компонентов антиоксидантной системы. Так, параметры общей антиоксидантной активности не коррелировали с другими показателями низкомолекулярных антиоксидантов и уровнем активности СОД. Это указывает на то, что в условиях *in vitro* вклад компонентов в антиоксидантную защиту не равнозначен. При сопоставлении морфологических характеристик с остальными результатами наблюдали прямую зависимость между некоторыми величинами. А именно, у более интенсивно развивающихся растений (с увеличенными размерами корня, листьев и побегообразования) отмечено более высокое содержание каротиноидов, флавоноидов и общей активности СОД. Установлено, что для

D.purpurea и *C.roseus* оптимальным является LED-освещение с соотношением К/С 2,3/1, а для *A.lanata*- 1,3/1.

Таким образом, LED-излучение может стать инструментом, позволяющим управлять и процессами биосинтеза вторичных метаболитов и ростом и развитием растений *invivo* *invitro*.

Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант №Б16К-050) и Украинского фонда фундаментальных исследований (грант №F73/65-2016)

Список литературы:

1. *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques / A. Pietrosiuk [et al.] // *Phytochemistry reviews*. – 2007. – Vol. 6. – P. 459–473.
2. Loyola-Vargas V.M. Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus* / V.M. Loyola-Vargas [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 1992. – Vol. 140. – P. 213–217.
3. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures / J. Zhao [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2001. – Vol. 33. – P. 43–49.
4. Ohashi K.K. Growth and alkaloids production in Madagascar periwinkle plants grown under red LED: 2013 IFAC Bio-Robotics Conference / Sakai, Japan: K.K. Ohashi [et al.]. – Vol. 1 (1). – P. 274–277.
5. Demotes-Mainard S. Plant responses to red and far-red lights, application in horticulture / S. Demotes-Mainard [et al.] // *Environmental and experimental Botany* - 2016 – Vol. 121. - P. 4-21.

БОТАНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕРЕДЫ СРОСТНОЙ (*BIDENSCONNATUS* WILLD., ASTERACEAE) – ИНВАЗИОННОГО ВИДА ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ

Молчан О.В.¹, Ханько А.В.², Джус М.А.², Скуратович Т.А.¹

¹ ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН
Беларуси», г. Минск, olga_molchan@mail.ru

² Белорусский государственный университет, dzhus_maxim@mail.ru

Приводятся сведения о характере распространения, фитоценотической приуроченности и биохимическом составе инвазионного вида череды сростной (*Bidensconnatus* Willd.) на территории Беларуси. В настоящее время *Bidensconnatus* зарегистрирована во всех административных областях, но наиболее часто встречается в южных и центральных районах страны. В Беларуси вид морфологически однороден и относится к наиболее распространенной в Европе *var. fallax* (Warnst.) Sherff. Исследовано содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов в траве и различных органах растений. Наибольшая концентрация