

УДК 581.19:57.086.83

О. В. КОПАЧ<sup>1</sup>, Н. В. ПУШКИНА<sup>2</sup>, А. А. КУЗОВКОВА<sup>1</sup>, В. А. КАРПОВИЧ<sup>2</sup>**ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ СВЕРХВЫСОКИХ ЧАСТОТ НИЗКОГО УРОВНЯ МОЩНОСТИ НА БИОСИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ *SILYBUM MARIANUM* L.**<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: olga-kopa@mail.ru,<sup>2</sup>Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Минск

(Поступила в редакцию 02.10.2014)

**Введение.** Лекарственные растения являются природными источниками ценных биологически активных веществ (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 могут стать культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Биотехнологические подходы позволяют получать продукт независимо от внешних климатических и почвенных условий, круглогодично, сохраняя при этом естественные ареалы ценных лекарственных растений [2, 3]. Основным недостатком данных технологий является низкий конечный выход продукта. Вследствие этого актуальным представляется определение условий, 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 физического стимулятора биосинтеза БАВ может быть использована обработка культур *in vitro* электромагнитным полем сверхвысоких частот (ЭМП СВЧ).

Действие ЭМП СВЧ на различные биологические объекты активно изучается в течение последних 25 лет [4], однако до сих пор клеточные культуры *in vitro* высших растений не рассматривались как объекты исследования. В частности, А. Х. Тамбиев и др. [5–10] исследовали влияние ЭМП СВЧ на фотосинтезирующие организмы (одноклеточные водоросли). Было 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 А. Х. Тамбиева и др. [5–10], под действием ЭМП СВЧ в клетках водорослей происходит образование и накопление активных радикалов кислорода и перекисей, что приводит к развитию автокаталитических (типа цепных) реакций, которые, ускоряя мембранный транспорт и интенсификацию фотосинтетических процессов, оказывают, таким образом, стимулирующий эффект на физиологические параметры фотосинтезирующих организмов [11, 12]. Нами сделано предположение, что такой же стимулирующий эффект ЭМП СВЧ по сходному механизму может наблюдаться и на нефотосинтезирующих организмах, в частности для каллусной культуры растений, культивируемой в темноте.

Цель исследования – изучить изменения в метаболизме каллусных культур расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) на основе анализа содержания в их клетках флавоноидов и оксикоричных кислот после воздействия на культуры электромагнитного поля сверхвысоких частот.

**Материалы и методы исследования.** Каллусы венгерского сортообразца расторопши пятнистой белоцветковой расы получали на среде Мурашиге–Скуга (МС), содержащей гормоны 2,4-D (1 мг/л) и кинетин (0,4 мг/л), из листовых, стеблевых, корневых и семядольно-листных эксплантов-сегментов (размером 4 мм) 17-дневных асептических растений. Пассирование каллусов на свежую МС среду с добавлением гормонов бензиламинопурина (2 мг/л) и нафтилуксусной кислоты (1 мг/л) проводили каждые 14–17 дней. В дальнейшем каллусы культивировали в темноте при температуре 25 °С. Для анализов использовали каллусы разной степени дедифференциации 4-го и 27-го пассажей. Обработку каллусов ЭМП СВЧ (в миллиметровом диапазоне волн, время обработки 20 мин, мощность 10 мВт) осуществляли в лаборатории радиофизических исследований Института ядерных проблем БГУ.

Биологические эффекты ЭМП СВЧ каллусных культур *S. marianum* на метаболизм оценивали в сравнении с аналогичными эффектами у каллусов, не подвергнутых обработке (контроль).

Экстракцию фенольных соединений проводили по методике, описанной в Государственной фармакопее Республики Беларусь [13]. Содержание флавоноидов и оксикоричной кислоты определяли по методу, предложенному в работе [14]. Суммарное содержание флавоноидов оценивали в пересчете на лютеолин в %/г сырого веса:

$$X = \frac{A \cdot 60}{m \cdot 560,8 \cdot 1 \text{ см}},$$

где  $A$  – оптическая плотность, 60 – количество разведений,  $m$  – масса навески испытуемого сырья (г), 560,8 – удельный показатель поглощения 1 %-ного раствора лютеолина в слое (кювете) толщиной 1 см при длине волны 330 нм и в этиловом спирте.

Содержание оксикоричной кислоты (моль/л/г сырого веса) рассчитывали по формуле

$$X = \frac{A \cdot 60}{m \cdot 19\,000 \cdot 1 \text{ см}},$$

где  $A$  – оптическая плотность, 60 – количество разведений,  $m$  – масса навески испытуемого сырья (г), 19 000 – молярный коэффициент экстинкции (поглощения) для оксикоричной кислоты в этиловом спирте в слое (кювете) толщиной 1 см при длине волны 330 нм.

Все анализы проводили в 6-кратной повторности, полученные результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ содержания флавоноидов и оксикоричных кислот в каллусах *S. marianum* показал, что ЭМП СВЧ оказывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез исследуемых БАВ. Так, содержание флавоноидов и оксикоричных кислот в корневом и листовом каллусах 4-го пассажа увеличивалось на 20 % по сравнению с контролем, а в стебле-

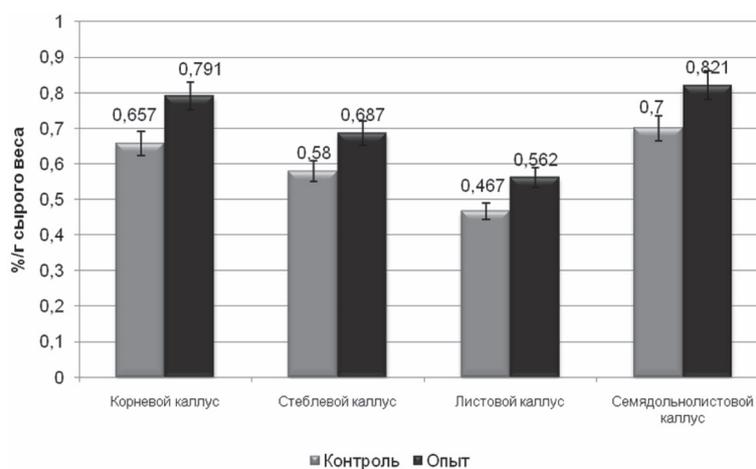


Рис. 1. Содержание флавоноидов в каллусе *S. marianum* сортообразца венгерской селекции 4-го пассажа после воздействия на него ЭМП СВЧ

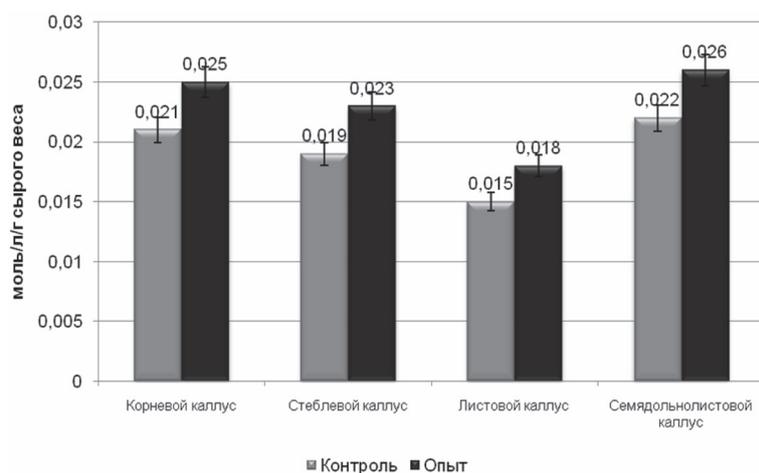


Рис. 2. Содержание оксикоричных кислот в каллусе *S. marianum* сортообразца венгерской селекции 4-го пассажа после воздействия на него ЭМП СВЧ

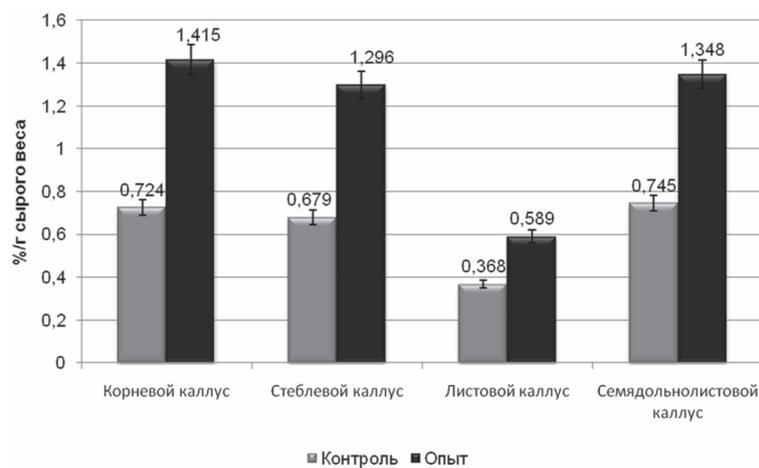


Рис. 3. Содержание флавоноидов в каллусе *S. marianum* сортообразца венгерской селекции 27-го пассажа после воздействия на него ЭМП СВЧ

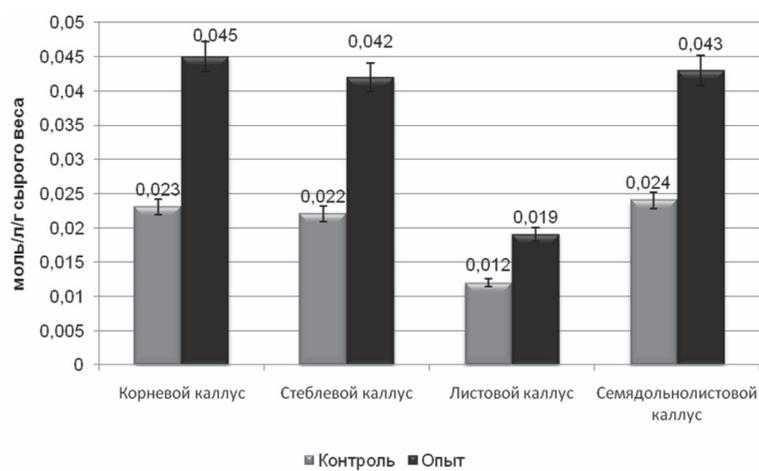


Рис. 4. Содержание оксикоричных кислот в каллусе *S. marianum* сортообразца венгерской селекции 27-го пассажа после воздействия на него ЭМП СВЧ

вом и семядольно-листовом – на 19 и 17 % соответственно (рис. 1, 2). Тенденция к увеличению содержания исследуемых веществ наблюдалась и при обработке длительно пассируемого каллуса 27-го пассажа. Содержание флавоноидов в корневом каллусе возросло на 96 %, в стеблевом – на 91, в семядольно-листовом и листовом – на 81 и 60 % соответственно (рис. 3). При анализе содержания оксикоричных кислот наблюдалась сходная ситуация: в листовом каллусе 27-го пассажа содержание увеличивалось на 59 %, в семядольно-листовом – на 79, в стеблевом – на 91, а в корневом – на 96 % (рис. 4).

Как видно, ЭМП СВЧ сильнее стимулировал биосинтез БАВ в «старых» сильно дедифференцированных каллусах, чем в «молодых» и сохранивших элементы дифференциации, при этом исходные уровни исследуемых БАВ у данных каллусов были одинаковыми. Возможно, каллусные клетки в состоянии полной дедифференциации лучше воспринимают внешние электромагнитные сигналы, на более высоких уровнях генерируют ответ различных радикалов и, как следствие, активируют биосинтез флавоноидов и оксикоричных кислот.

**Заключение.** ЭМП СВЧ оказывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез вторичных метаболитов в клетках каллусных культур *S. marianum*. При этом длительно пассируемые каллусы более отзывчивы к воздействию ЭМП СВЧ, чем каллусы первых пассажей.

## Литература

1. Verpoorte R. // Phytochem. Rev. 2002. Vol. 1. P. 13–25.
2. Rao R. S. // Biotechnol. Adv. 2002. Vol. 20. P. 101–153.
3. Karuppusamy S. // J. of Med. Plants Res. 2009. Vol. 3, N 13. P. 1222–1239.
4. Девятков Н. Д., Голант М. В., Бецкий О. В. // Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн. М., 1994.
5. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Яковлева М. Н. и др. // Применение ММ излучения низкой интенсивности в биологии и медицине: сб. ст. М., 1986. С. 178.
6. Tambiev A. H., Gusev M. V., Kirikova N. N. et al. // Trade Exhibition Microbe-86. XIX Inter. Congr. Microbiol. 1986. P. 201.
7. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Лапшин О. М. и др. // Изменение реакционной способности экзометаболитов синезеленой водоросли спирулина под действием ММ излучения. М., 1987. С. 235.
8. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Лапшин О. М. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1990. № 1. С. 125.
9. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н., Лапшин О. М., Гусев М. В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1990. № 2. С. 98.
10. Tambiev A. H., Kirikova N. N. // Biol. aspects of low intensity millimeter waves. 1994. № 7. С. 87.
11. Tambiev A. H., Kirikova N. N., Lapshin O. M., Gusev M. V. // 8<sup>th</sup> Int. Biotech. Symp. Paris, 1988. P. 153.
12. Тамбиев А. Х., Кирикова Н. Н. // Биомед. радиоэлектроника. 1998. № 3. С. 69.
13. Ширяков А. А., Марченко С. И. // Государственная фармакопея Республики Беларусь. М., 2007. Т. 3.
14. Baner N., Leljak-Levanic D., Jelaska S. // Verlag der Zeitschrift fur Naturforschun. 2004. Bd. 59. S. 554–560.

O. V. KOPACH, N. V. PUSHKINA, A. A. KUZOVKOVA, V. A. KARPOVICH

### EFFECT OF ELECTROMAGNETIC FIELD OF ULTRA HIGH FREQUENCY LOW POWER ON THE BIOSYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN CELL CULTURES *SILYBUM MARIANUM* L.

#### Summary

The stimulatory effect of ultra high frequency low power electromagnetic field on the biosynthesis of secondary metabolites by the callus cultures of white flowers race *Silybum marianum* L. was detected. The response level of the *S. marianum* callus cells was depended on the cell dedifferentiation degree.