

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В НИКИТСКОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ - НАЦИОНАЛЬНОМ НАУЧНОМ ЦЕНТРЕ

В.Н. ЕЖОВ, доктор технических наук, профессор, академик УААН
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Практически 200-летняя работа специалистов Никитского сада по привлечению природного растительного потенциала и созданию новых сортов и форм растений не могла не сопровождаться всесторонним изучением постоянно прирастающего генофонда с позиций его практического использования, что предопределило рождение и развитие научного направления – биохимии растений и сопровождающих их субпродуктов. По существу биохимия растений в Саду зародилась с момента создания Магарачского винподвала, в котором велись технологические журналы по контролю сахаристости и кислотности винограда, спиртуозности вин, однако этот этап справедливо отнести не столько к научным, сколько к сугубо производственным. Тем не менее, накопленные многолетние данные позволили со временем перейти к определенным обобщениям, более соответствующим критерию научных: в 1903 г. М.А. Ховренко и Н.И. Казаринов публикуют статью о природе углеводов виноградного сока [21], в 1916 г. А.М. Фролов-Багреев подводит итоги наблюдений за урожайностью, сахаристостью и кислотностью имеющихся на ЮБК сортов винограда [20]. В этот период выходят в свет также статьи В.Н. Любименко, посвященные хлорофиллу и сопряженным биокомпонентам (каротин, пероксидаза), однако на эти исследования с полным правом могут претендовать скорее физиологи [13, 14].

Черту многолетних биохимических исследований винограда и вина, проведенных в Саду, подводит статья С.Д. Львова (1928), в которой осуществляется попытка связать буферные свойства сока винограда с его "актуальной" (активной) кислотностью [15], с этого периода начала самостоятельную жизнь Магарачская опытная станция виноградарства и виноделия (позднее НИВиВ "Магарач") и для Никитского сада это направление стало неперспективным.

Последующий довоенный период справедливо охарактеризовать как годы становления и бурного развития биохимии эфиромасличных культур: появляется целая серия публикаций Е.В. Вульфа, В.И. Нилова [4, 5], В.В. Вильямса [8], Л.А. Михельсона [16] и других авторов, освещающих наличие, состав и содержание эфирных масел в растительной биомассе лаванды, тысячелистника, шалфея, полыни, эстрагона, перовский, камфорного базилика, ажгона, мяты, можжевельника, тмина, кориандра, масличной розы, фенхеля. Венцом этих работ явилось издание в 1938 г. 6-го, а в 1940 – 7-го тома "Биохимии культурных растений", причем в последнем были собраны сведения о биокомпонентах маслины, миндаля, абрикоса и персика [5].

Военный период закономерно прервал восходящую динамику биохимических исследований; более того, в силу определенных причин, "эфиромасличное" направление отодвинул почти на 30 лет.

Только с 1957 г., с появлением публикаций А.П. Дегтяревой относительно антибиотических свойств некоторых компонентов мирта и эвкалипта [10], биохимия растений в Саду фактически возрождается. В 1962 г. А.П. Дегтярева защищает кандидатскую диссертацию по упомянутой теме исследований [11], и это знаменует собой лавинообразное появление работ в области выявления источников, идентификации и оценки растительных антибиотиков. Нилов Г.И., Щербановский Л.Р. вслед за А.П. Дегтяревой исследуют антимикробные свойства экстрактов из биомассы питоспорума, юкки, маслины, хвои кипариса, сосны [22, 23]; в 1968 г. Л.Р. Щербановский защищает кандидатскую диссертацию по проблеме состава и антибиотическим по отношению к винным дрожжам свойствам некоторых растений: выделенный и позднее очищенный препарат получает название

плюмбагин [23]. Успехи в идентификации природных антибиотиков позволяют Л.Р. Щербановскому в дальнейшем оперировать такими терминами, как сапонины, стероидные гликоалкалоиды, нафтохиноны, природные кумарины [24, 25]. Между тем список растительных источников веществ, проявляющих антибиотические свойства, расширяется: в него включаются красные сорта винограда и, соответственно, вина [7], в том же году Кривенцов В.И. изучает антивирусные свойства плодов фейхоа и зизифуса, укропа, железницы. Продолжая активное сотрудничество с институтом "Магарач", в 1974 г. Л.Р. Щербановский с группой коллег-виноделов получает авторское свидетельство СССР на состав для предохранения вин от испарения, окисления и микробиальной порчи. В 1976 г. Г.И. Нилов и Ю.А. Акимов публикуют материалы исследования антимикробных и антивирусных свойств отходов можжевельника; в этом же году выходит том трудов ГНБС "Биохимия южных плодовых и декоративных культур", в котором среди прочих фигурируют статьи Л.Р. Щербановского и коллег в области растительных нафтохинонов, Ю.А. Акимова – по антимикробным свойствам можжевельников. В последующие 3-4 года появляются публикации Ю.А. Акимова с соотр. касательно состава и свойств эфирных масел тополя, можжевельника казацкого [17], Л.Р. Щербановского – по идентификации и проверке ингибирующих свойств флороглюцидов папоротника относительно молочнокислых бактерий, Г.И. Нилова с соотр. – относительно выявления юглона в листьях и плодах грецкого ореха. В этот период Ю.А. Акимов уточняет предмет своих исследований, сосредотачивая свое внимание на терпеновых соединениях как потенциальных природных ингибиторах; более того, его интересуют такие теоретические проблемы, как связь летучих терпенов с хемосистематикой растений, вопросы эволюции строения летучих терпенов, антиоксидантная активность природных растительных соединений; в практическом плане он делает все больший упор на использование этих соединений для лечения неспецифических хронических заболеваний и профилактики болезней человека. В 1984 г. эстафету в области исследований терпеновых соединений (источники, состав, свойства, хемосистематические признаки) подхватывает Ю.М. Фадеев [19].

Между тем, параллельно со столь мощным направлением биохимических исследований, в ГНБС с конца 60-х годов прошлого столетия возрождается и постепенно расширяется прерванное с 1941 г. направление в области биохимии южных плодовых культур. В течение последующих лет (по существу, продолжаясь и сейчас) это направление имеет достаточно четкий набор задач: выявление перспективных источников биологически активных веществ (БАВ), оценка перспектив практического использования полученных данных, а также аналитическое сопровождение селекционного процесса. В 1969 г. В.И. Кривенцов публикует данные динамики накопления рутина и аскорбиновой кислоты в листьях зизифуса [12]; на следующий год он представляет сведения о катехинах плодов фейхоа, а Л.П. Давидюк – о пектине персика. В 1971 г. появляется первая из многолетних публикаций А.А. Рихтера в области исследований белков и липидов персика; они определенное время идут в соавторстве с В.Х. Пыжовым [18], позднее – становятся самостоятельными. Параллельно Л.П. Давидюк расширяет круг изучаемых БАВ персика, вовлекая в него витамины и ферменты, а также каротиноиды; в 1973 г. она защищает кандидатскую диссертацию [9]. В 1974-75 гг. выходят в свет работы В.И. Кривенцова по флаваноидам листьев маслин, А.А. Рихтера – по свободным аминокислотам диких видов миндаля, Л.П. Давидюк и С.В. Барановой – по осветлению соков пектолитическими ферментами. 69-й том трудов ГНБС (1976 г.) большей частью посвящен аналогичным исследованиям: в нем – работы Л.П. Давидюк по тиамину и пектиновым веществам персика, С.В. Карахановой – по каротиноидам абрикоса, А.А. Рихтера – по запасным веществам семян миндаля, С.В. Барановой – по оценке растений как сырья в производстве безалкогольных напитков. В 1979 г. С.В. Баранова защищает кандидатскую диссертацию по теме биохимического исследования растительных экстрактов как основе совершенствования технологий их получения. В 1981 г. группа сотрудников ГНБС получает авторское свидетельство СССР на безалкогольный диабетический продукт – напиток "Миндальное

молоко". Уже наметившийся крен биохимических работ Сада в пользу БАВ плодовых культур подтверждается очередным томом трудов (1981): в нем – результаты исследований Л.П. Давидюк по каротиноидам, лигнину и пектину персика, С.В. Барановой – по БАВ пряноароматических растений в безалкогольных напитках, С.В. Карахановой – по жирному маслу плодов гибридов маслины; В.И. Кривенцова – по каротиноидам и антоцианам граната, А.А. Рихтера и В.Х. Пыжова – по белку и липидам миндаля и грецкого ореха.

Подобного рода исследования продолжаются и в последующие годы; к ним добавляются оригинальные работы Т.Н. Жебентяевой по электрофоретическому разделению белков плодовых культур (абрикос, персик и др.) как одному из перспективных методов оценки эффективности селекционного процесса.

К сожалению, в силу редчайшего сочетания различных объективных и субъективных причин (развал Союза, уход из жизни признанных лидеров, смена другими места работы и жительства) привели к тому, что к середине 90-х годов биохимия растений в Саду оказалась в стадии глубокой стагнации и даже потеряла статус самостоятельного отдела. Ее формальное возрождение началось в 1999 г. – восстановлением отдела биохимии растений (с 2003 г. – отдел биотехнологии и биохимии растений). Следует признать, что о фактическом возрождении биохимического направления – в той мере, каким оно было в своем апогее – говорить пока рано: сказывается, прежде всего, дефицит квалифицированных кадров. Тем не менее, с большой уверенностью можно говорить о претензиях "никитских" биохимиков XXI ст. на такие традиционные вопросы, как скрининг растительного потенциала НБС-ННЦ в направлении поиска биологически активных веществ и оценка перспективных направлений использования этого потенциала в пищевой промышленности, медицине, парфюмерии и косметике; биохимическое сопровождение селекционных процессов в плододовстве южных культур с попыткой установления коррелятивных связей как эталона "моделирования" идеального сорта; отдельную перспективу представляют собой природные антиоксиданты, переоценить роль которых в жизнедеятельности человека попросту невозможно. Появление после долгого перерыва специального тома трудов НБС само по себе говорит о том, что биохимическое направление в Саду постепенно крепнет, у него – хороший задел и оптимистичное будущее.

Список литературы

1. Акимов ЮА. Использование летучих терпенов в систематике растений / В кн.: Хемосистематика и эвол. биохимия высших растений. – М.: ГБС АН СССР. – 1979. – С. 3-8.
2. Бенкен А.А., Рихтер А.А. Биохимическое изучение плодов миндаля в процессе созревания // Тр. ГНБС. – 1971. – Т. 52. – С. 125-143.
3. Биологически активные вещества плодовых, пряноароматических и декоративных растений // Труды ГНБС. – 1981. – Т. 73. – 147 с.
4. Биохимия культурных растений / Под ред. Е.В.Вульфа. – 1938. – Т. 6. – 192 с.
5. Биохимия культурных растений / Под ред. Е.В.Вульфа и В.И.Нилова. – 1940. – Т. 7. – 202 с.
6. Биохимия южных плодовых и декоративных культур // Труды ГНБС. – 1976. – Т. 69. – 125 с.
7. Валушко Г.Г., Маркосов В.А., Кривенцов В.И., Нилон Г.И. Антимикробные и противовирусные свойства красного столового вина // Труды ВНИИВиВ "Магарац". – 1973. – Т. 12. – С. 53-56.
8. Вильямс В.В., Смирнов В.С. О составе эфирного масла из *Lavandula Vera* крымского происхождения // Ж.общей химии. – 1936. – Т. 6, Вып. 2. – С. 190-196.
9. Давидюк Л.П. Биохимическая характеристика плодов разных сортов персика в процессе созревания: Автореф. канд. дис. – Киев, 1973. – 16 с.
10. Дегтярева А.П. Об антибиотических свойствах мирта обыкновенного // Бюлл. НТИ ГНБС. – 1957. – Т. 3. – С. 64-69.

11. Дегтярева А.П. Об антимикробных веществах мирта и эвкалиптов: Автореф. канд. дис. – Киев, 1962. – 17 с.
12. Кривенцов В.И., Караханова С.В. Динамика накопления рутина и аскорбиновой кислоты в листьях зизифуса // Бюлл. ГНБС. – 1969. – Т. 3. – С. 57-59.
13. Любименко В.Н. О превращениях пигментов пластид в живой ткани растения // Зап. Акад. наук по физ.-мат. отделу. – 1916. – Т. 33, № 12. – 280 с.
14. Любименко В.Н. Пигменты пластид и распределение пероксидазы по разным органам и тканям у высших растений // Изв. бот. Сада Петра Великого. – 1916. – Т. 16, № 1-2. – С. 1-22.
15. Львов С.Д. Об актуальной кислотности и буферных свойствах винограда и некоторых других плодов // Доклады АН СССР – 1928. – С. 221-226.
16. Михельсон Л.А. Эфирное масло из *Perovskia abrotanoides* Kar. // Тр. Никит. ботан. сада. – 1936. – Т. 20, Вып. 1. – С. 77-82.
17. Остапчук И.Ф., Акимов Ю.А., Шуткин В.М. Применение летучих терпенов растений для лечения больных хроническими неспецифическими заболеваниями // Рац. использование и охрана курортных и рекреаци. ресурсов Крыма. – Киев, 1982. – С. 54-55.
18. Пыжов В.Х. Накопление белка и жирного некоторыми межсортовыми гибридами миндаля // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 1972. – Вып. 2 (18). – С. 72-77.
19. Фадеев Ю.М., Акимов Ю.А. Распределение тритерпеновых гликозидов в крымских растениях семейства бобовых // Тр. Всес. совещ. "Актуальные задачи физиол. и биохим. растений в ботсадах СССР. – Пушкино, 1984. – С. 190.
20. Фролов-Багреев А.М. Об урожайности, сахаристости и кислотности главнейших разводимых на Южном берегу сортов // Записки Никитского сада. – 1916. – Т. 7. – С. 29-39.
21. Ховренко М.А., Казаринов Н.И. Природа сахаристых веществ виноградного суслу // Тр. Ком-та виноградарства об-ва с.-х. южной России. – 1903 – Т. 2. – С. 140-154.
22. Щербановский Л.Р. Химические и антимикробные свойства растительных антибиотиков, подавляющих винные дрожжи, МКБ и УКБ: Автореф. канд. дис. – Киев, 1968. – 16 с.
23. Щербановский Л.Р., Нилов Г.И. *Ceratostigma plumbaginoides* Bunge – продукт антибиотического вещества, подавляющего развитие дрожжей, МКБ и УКБ // Растит. ресурсы. – 1969. – Т. 5. – С. 581-586.
24. Щербановский Л.Р. Антимикробные свойства сапонинов и стероидных гликоалкалоидов / Растит. ресурсы. – 1971. – Т. 7, Вып. 1. – С. 133-141.
25. Щербановський Л.Р. Наявність шиконіну в деяких видах родини шорстколистних і його вплив на МКБ // Укр. бот. ж. – 1971. – Т. 28, № 4. – С. 504-508.

Results and perspectives of biochemical researches in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

Ezhov V.N.

The history of development of phytochemistry in Nikitsky Botanical Gardens, contribution of the NBG-NSC's scientists in development of science of our country, prospects of the further biochemical researches are demonstrated.

НЕПРЯМОЙ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS* SP.)

И.В. МИТРОФАНОВА¹, кандидат биологических наук;

О.И. СОКОЛОВ², доктор биологических наук;

В.Н. ЕЖОВ¹, доктор технических наук

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Институт биохимии и физиологии растений микроорганизмов РАН

В Никитском ботаническом саду находится одна из крупнейших коллекций декоративных, плодовых, эфиромасличных и лекарственных растений. Большинство культур можно отнести к трудноразмножаемым растениям, перспективным для озеленения как открытого, так и закрытого грунта и имеющим народнохозяйственное значение.

Род *Clematis* L. – ломонос принадлежит к семейству лютиковых (*Ranunculaceae* Juss.). Это – нежная и ломкая самоцепляющаяся лиана. Крупноцветковые клематисы размножают вегетативным путем, так как большинство гибридных сортов практически не завязывают семена. Наряду с этим, выращенные сеянцы часто недостаточно декоративны и не сохраняют свойств материнского растения. Известно, что клематисы необычайны по своей красоте и привлекательности. Наряду с этим, многие виды клематиса имеют большое народнохозяйственное значение, так как содержат эфирные масла, дубильные вещества, витамин С, фитонциды, а также обладают фунгицидным действием, подавляя развитие плесневых грибов. Известны виды клематиса, используемые в тибетской, китайской и монгольской медицине [6, 15].

Существующие традиционные методы размножения данной культуры не позволяют с высокой долей эффективности получать достаточное количество как посадочного материала, так и сырья для пищевой и медицинской промышленности. Современные биотехнологические методы, используя свойство клетки растений – тотипотентность, позволяют успешно тиражировать редкие и единичные растения, а также перспективные и новые сорта. Одним из таких способов является соматический эмбриогенез, представляющий собой процесс асексуального развития зародышеподобных структур из репродуктивных и соматических тканей путем, напоминающим зиготический эмбриогенез [18]. Английские ученые, проводившие свои исследования на клематисе *Clematis integrifolia* × *C. viticella*, не сообщали о каких-либо изменениях в геноме растений, полученных через культуру *in vitro* [31]. Однако ими не были досконально изучены особенности регенерации растений клематиса в условиях *in vitro*. Кроме того, ученым не удалось определить основные факторы, влияющие на пути реализации морфогенетического потенциала органов и тканей исследуемого растения.

Впервые исследования по изучению процессов соматического эмбриогенеза клематиса были начаты в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [34]. В процессе исследования ставился ряд задач. Необходимо было выявить основные факторы, влияющие на морфогенетический потенциал органов и тканей клематиса, и, кроме того, изучить этапы соматического эмбриогенеза, получить регенерацию полноценных растений, представив в результате биотехнологическую методологию получения регенерантов из незиготических зародышей.

Результаты, представленные в этой статье, касаются изучения особенностей непрямого соматического эмбриогенеза клематиса на примере сорта Серенада Крыма и оценки роли абиотических и биотических факторов в процессе регенерации растений через непрямо соматический эмбриогенез.

Материалы и методы

Эксперименты по культуре органов и тканей клематиса проводили на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада УААН –

Национального научного центра в 1996-2005 гг. Гистохимические исследования выполнены в лаборатории физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия).

Для исследований был отобран сорт Серенада Крыма, принадлежащий к группе Ланугиноза. Представители этой группы характеризуются массовым цветением весной на перезимовавшем приросте прошлого года. Летом или осенью более слабое цветение может повториться на приросте текущего года. Побеги достигают длины 2,5 см. Цветки – широко раскрытые, как правило одиночные, крупные диаметром 16-20 см, из 6-8 чашелистиков, преимущественно светлой окраски.

В качестве исходных эксплантов были использованы побеги с почками, которые отбирали в период с февраля по апрель.

Для снижения контаминации побеги с почками клематиса предварительно протирали 96%-ным этанолом. В процессе собственно стерилизации растительных эксплантов использовали 70%-ный этиловый спирт и 4%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента Tween-80 (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «Fastran Lf» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали три состава питательных сред, наиболее часто применяемых при размножении деревьев и кустарников. Эти среды содержат минеральные соли по прописям Гамборга и Эвелеге (B5) [25], Мурасиге и Скуга (МС) [36] и Пирика [39]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамин-НСl, 2,43 мкМ пиридоксин-НСl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 2-3% сахарозы, 0,8% агара, 0,9 мкМ БАП, 0,04 мкМ ИМК. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* клематиса в питательную среду вводили следующие фитогормоны: 6-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил-амин)-пурин (зеатин) *Sigma*, США в концентрации 0,4-6,9 мкМ; β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК) *Sigma*, США – 0,04-4,5 мкМ; 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) *Sigma*, США – 0,9-4,8 мкМ.

Пробирки и колбы с эксплантами помещали в культуральную комнату, где в зависимости от культивируемого объекта исследования и эксперимента поддерживалась температура 20-30°C, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения 5-60 мкМ м⁻² с⁻¹ и 70%-ная относительная влажность воздуха. Субкультивирование тканей и органов проводили через 15-30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5%-ного глутарового альдегида с 2%-ным формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при -20 °С, после чего заливали в ПЭГ-1500 [5, 13, 14]. Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон. Срезы окрашивали акридиновым оранжевым (АО – ядра клеток светятся ярко-зеленым, ядрышки – желтовато-красного цвета), удаляя ПЭГ-1500 дистиллированной водой, покрывая срезы акридиновым оранжевым (0,1%) на 2-3 мин, промывая затем дистиллированной водой. При окраске толуидиновым синим (краситель для нуклеиновых кислот) срезы доводили до воды, окрашивали 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего на 2-3 мин, ополаскивали в дистиллированной воде. При окраске DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indole. (*Sigma*, США) – флуоресцентный краситель на ядерную ДНК срезы доводили до воды, окрашивали DAPI в течение 10 мин, затем промывали дистиллированной водой. Срезы подсушивали и заключали в синтетическую среду DePex (*Serva*, Германия).

Все препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DMLB» (Германия), который работает как в режиме флуоресценции, так и в режиме обычного просвечивающего микроскопа.

Результаты и обсуждение

Большинство растений клематиса, находящихся в коллекционном генофонде НБС-ННЦ, являются возрастно-старыми. Изучение морфогенетических потенциалов тканей и органов взрослого растения в условиях *in vitro* представляет большой научный и практический интерес. Прежде всего это связано с тем, что использование в качестве первичного экспланта ткани взрослого растения позволяет получать посадочный материал с хозяйственно ценными признаками. Однако работа с материалом от взрослых растений затрудняется тем, что с увеличением возраста в тканях и органах растения происходят процессы, приводящие к ингибированию роста и регенерационной способности. Полученные в результате регенерации микропобеги характеризуются медленным ростом и низкой способностью к укоренению. Несмотря на это, ученые всего мира, работающие над этой проблемой, продолжают свои исследования и разрабатывают все новые и новые биотехнологии для каждой конкретной культуры [7, 17, 19-21, 23, 28, 32, 33].

Изучение влияния состава питательных сред на процессы индукции развития вегетативных почек

Разработка биотехнологии получения растений невозможна без подбора питательных сред. Как показали наши исследования, культивирование изолированных почек клематиса на питательных средах, отличающихся по составу минеральных солей, концентрациями витаминов, фитогормонов, сахарозы и агара, приводило к различным морфогенетическим процессам.

В процессе эксперимента использовали три состава питательных сред, наиболее часто применяемых при размножении деревьев и кустарников. Эти среды содержат минеральные соли по прописям Гамборга и Эвелега (B5), Мурасиге и Скуга (МС) и Пирика. Исследуемые питательные среды отличаются друг от друга по содержанию азота, фосфора и калия. Так, например, в состав минеральных солей по МС азот, фосфор и калий входят в относительно высоких концентрациях. Соли по B5 содержат достаточное количество калия и фосфора и значительно меньше азота, по сравнению с прописью МС. Макросоли по Пирику содержат азота в 8 раз, а калия и фосфора в – 2 раза меньше, чем соли по МС.

Полученные результаты показали, что на всех испытанных вариантах сред почки клематиса сорта Серенада Крыма оставались зелеными, но регенерация микропобегов происходила только на средах МС и Пирика. Каллус, формирующийся в основании почек на среде B5, не давал им развиваться (табл. 1). Начало образования микропобегов отмечали на 10-14 сутки культивирования. На питательной среде МС образовывалось до трех дополнительных микропобегов. Через 2-3 месяца на средах Пирика и МС длина микропобегов достигала $9,0 \pm 0,1$ см. Однако на среде МС микропобеги имели ярко-зеленую окраску, количество междоузлий достигало в среднем $6,0 \pm 0,1$ на эксплант. На среде Пирика микропобеги были более тонкие и количество междоузлий достигало в среднем $2,5 \pm 0,1$ на эксплант. Поэтому в последующих экспериментах в качестве базовой среды была использована питательная среда МС.

Исследование воздействия фитогормонов на процесс непрямого соматического эмбриогенеза и прямого вторичного эмбриогенеза клематиса

Известно, что фитогормоны играют важную роль в осуществлении взаимодействия клеток, тканей и органов растений. Малые концентрации этих веществ необходимы для индукции и регулирования физиологических и морфогенетических процессов. Для каждого вида и сорта растения экспериментально подбираются соответствующие концентрации и соотношения фитогормонов в питательной среде. Так, цитокинины, помимо активизации клеточного деления и роста, стимулируют дифференциацию клеток, гистогенез и побегообразование. Они также влияют на дифференциацию каллуса, индуцируют развитие пазушных почек, рост боковых побегов, закладку адвентивных почек и последующую регенерацию растений [1-3, 9, 10, 41]. Ауксины, активизирующие процесс деления и растяжения клеток, необходимы для формирования проводящей системы и корней растений. Ткани, насыщенные ауксином, обладают аттрагирующим действием, то есть способностью притягивать питательные вещества,

которые затем откладываются как запасные в семенах, плодах, клубнях, корнеплодах или же активно используются в период роста и развития меристемы. Ауксины играют существенную роль в дифференциации клеток. Так, например, индукция деления покоящихся вакуолизованных паренхимных клеток с помощью ауксина представляет собой дедифференциацию. Наряду с этим, ауксин обуславливает явление апикального доминирования, то есть взаимную координацию роста главного и боковых побегов [4, 7, 28].

Таблица 1

Влияние минерального состава различных питательных сред на образование и регенерацию микропобегов из вегетативных почек клематиса сорта Серенада Крыма (через 30 сут после введения в условия *in vitro*)

Питательная среда	К-во почек, образующих микропобеги, %	Интенсивность регенерации*
Мурасиге и Скуга	70,5 ± 6,5	±
Гамборга и Эвелега	0	—
Пирика	87,6 ± 9,3	+

* + - активная регенерация (образование 2-3 микропобегов);
 ± - средняя регенерация (образование 1-2 микропобегов);
 — - слабая регенерация

После введения вегетативных почек и индукции их развития на первичных питательных средах МС и Пирика дальнейшее размножение клематиса осуществляли с помощью микрочеренкования побегов. В качестве вещества цитокининового типа действия нами был использован зеатин, а в качестве веществ ауксинового типа действия – ИМК и 2,4-Д. Микрочеренки с одним и двумя междоузлиями высаживали на питательную среду МС, содержащую 1,8 мкМ зеатина и 0,04 мкМ ИМК. В процессе культивирования в основании микрочеренков образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. Полученный каллус отделяли от основания микропобегов и микрочеренков и разделяли на сегменты, помещая на питательную среду, дополненную 2,4-Д и зеатином. Эффективность влияния различных концентраций 2,4-Д и зеатина на индукцию образования эмбрионного каллуса клематиса представлена в таблице 2.

Таблица 2

Индукция каллусообразования клематиса сорта Серенада Крыма на питательных средах с 2,4-Д и зеатином

Концентрация фитогормонов, мкМ	К-во эксплантов, образующих каллус, %	Тип каллуса, %*		
		Э	НЭ	С
контроль (0)	0	-	-	-
2,4-Д				
0,9	0	-	-	-
1,8	0	-	-	-
2,3	0	-	-	-
4,5	60 ± 2,3	-	100	-
6,8	52 ± 5,6	-	100	-
зеатин				
0,9	25 ± 2,1	25 ± 2,6	59 ± 2,3	16 ± 1,2
1,8	100	100	0	0
2,3	100	88 ± 6,6	5 ± 0,1	7 ± 0,1
4,6	86 ± 6,3	57 ± 4,9	10 ± 1,1	33 ± 4,6
6,9	72 ± 7,6	20 ± 1,2	69 ± 4,3	11 ± 1,0

* Э – эмбрионный; НЭ – неэмбрионный; С – смешанный; - - образование каллуса не происходит

Присутствие в питательной среде 2,4-Д в концентрации 4,5 мкМ и 6,8 мкМ стимулировало образование рыхлого неэмбрионного каллуса белого цвета. В процессе исследования нами было отмечено, что на среде, содержащей 1,8 мкМ зеатина, клетки культивируемого каллуса активно делились, и образующийся каллус имел плотную структуру. Эмбрионный каллус формировался также на средах, дополненных 2,3 мкМ и 4,6 мкМ зеатина. На питательных средах, содержащих 0,9 мкМ, 2,3 мкМ, 4,6 мкМ и 6,9 мкМ зеатина наблюдали образование каллуса смешанного типа.

Как показали наши исследования, в течение месяца отмечали появление меристематических зон и меристематических бугорков (рис. 1). Эти образования отличались от основной массы клеток ярко-зеленой окраской. Только гистологический анализ позволил продемонстрировать, что в эмбрионной массе имеются два типа клеток: первые клетки имели относительно плотную цитоплазму, достаточно тонкие клеточные стенки и очень мелкие вакуоли (эмбрионные клетки); вторые – мутную цитоплазму и крупные вакуоли (неэмбрионные клетки) (рис. 2, а). На третьи сутки культивирования активизировались процессы митотической и меристематической активности в эмбрионной массе клеток (рис. 2, б). Прозембрио начинал формироваться в результате асимметричных делений, чаще всего непосредственно внутри каллуса.

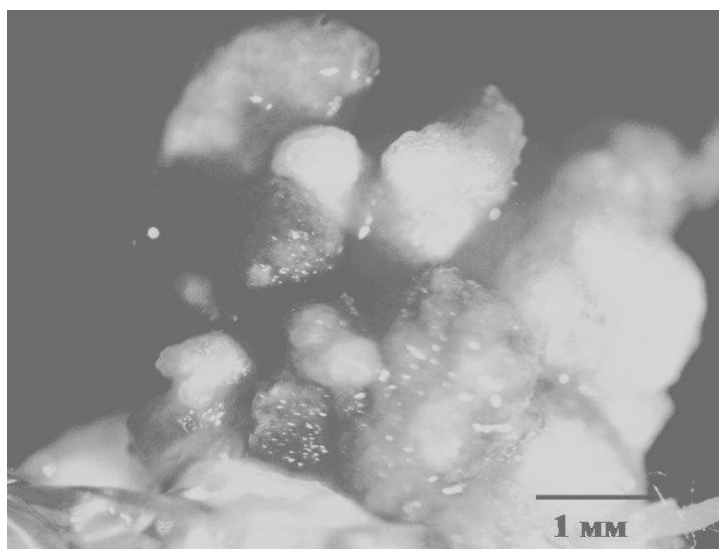


Рис. 1. Формирование меристематических бугорков на поверхности каллуса клематиса сорта Серенада Крыма

Теоретические исследования в области соматического эмбриогенеза показывают, что вся эмбрионная масса клеток детерминирована на процесс образования эмбриоида, но это не так. Только часть клеток способна к формированию соматического зародыша. Наблюдения на примере клевера и фисташки подтверждают гипотезу о том, что именно регуляторы роста инициируют асимметричное деление и приводят к изменению полярности клеток [30, 38]. Скорее всего, экзогенные регуляторы роста непосредственно изменяют полярность клеток путем интерференции градиента рН или электрического поля вокруг клеток.

Только после 12-14 суток культивирования в каллусе клематиса можно наблюдать образование соматических зародышей из индуцированных эмбрионных детерминированных клеток (рис. 2, в). Однако только на 27-30-е сутки был отчетливо виден сам зародыш (рис. 2, г).

Присутствие в среде зеатина индуцировало образование биполярных структур на поверхности и внутри каллуса. Визуально удалось наблюдать появление соматических зародышей на поверхности каллуса только через 5-7 суток после их формирования в самом каллусе. Все образовавшиеся незиготические зародыши имели светло-зеленую окраску и

плотное соединение с материнским каллусом. В процессе культивирования такого каллуса часть эмбриоидов свободно отделялась. Однако на их поверхности формировался каллус, который препятствовал их дальнейшему развитию.

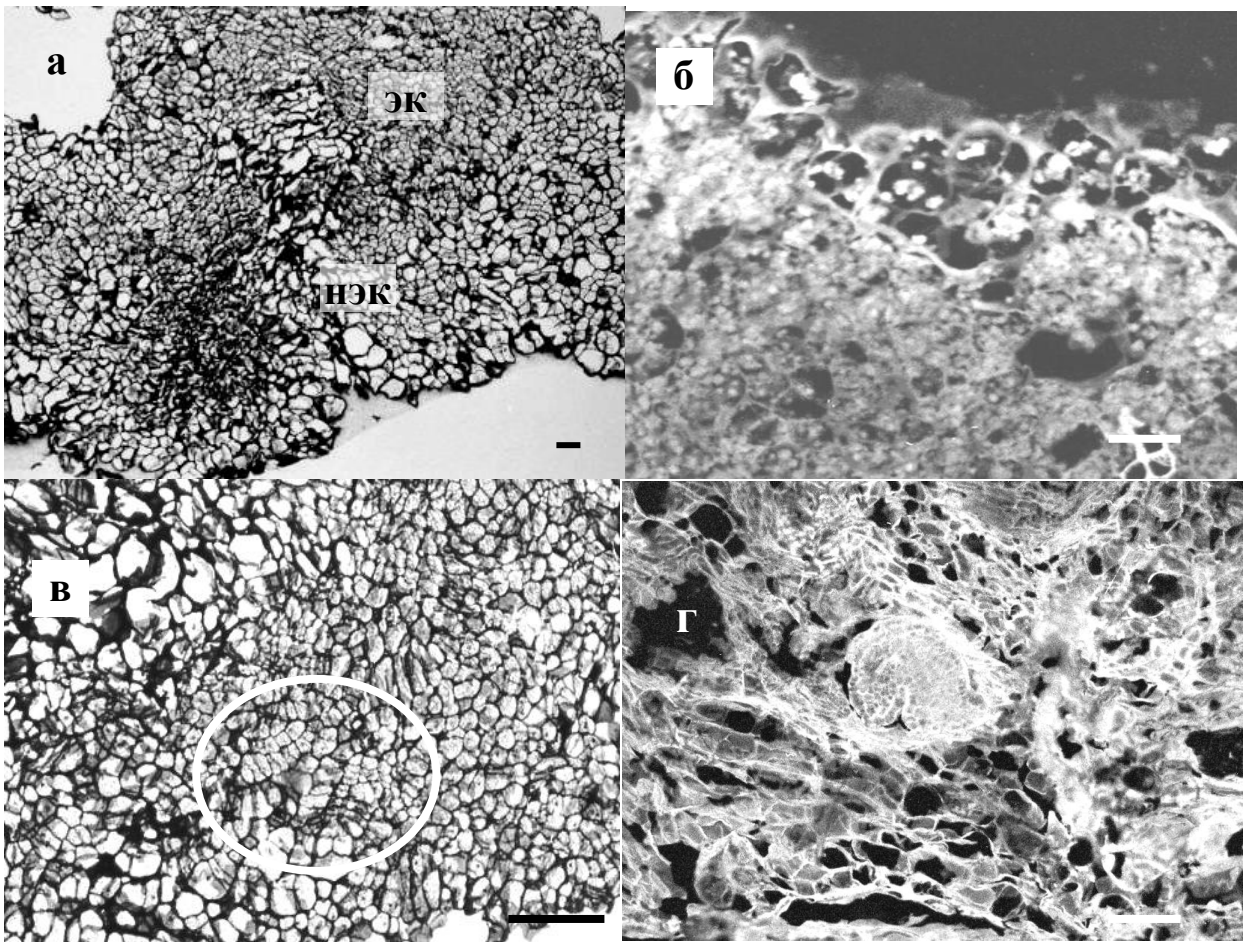


Рис. 2. Развитие соматических зародышей в эмбрионной клеточной массе клематиса: а) эмбрионные клетки (ЭК) и неэмбрионные клетки (НЭК) в каллусе; б) активизация клеточных делений в эмбрионной массе на 3-и сут культивирования; в) появления эмбриоподобных структур на 10-12-е сут культивирования; г) образовавшийся соматический зародыш

В таблице 3 представлены результаты образования соматических зародышей под влиянием различных концентраций зеатина. Так, максимальное количество эмбриоидов на эксплант ($25 \pm 2,6$ шт.) было получено на среде МС, дополненной $1,8 \text{ мкМ}$ зеатина через 4 недели культивирования. На стадии созревания в условиях *in vitro* отмечали образование глобулярных, сердцевидных и торпедовидных эмбриоидов подобно развитию зиготических зародышей. Подобное развитие биполярных структур отмечали и у других видов растений [26, 32, 35, 43]. Некоторые первичные экспланты клематиса формировали сферические структуры диаметром $0,1-0,5 \text{ мм}$, которые не развивались в полноценные растения.

Прорастание соматических зародышей происходило в течение достаточно длительного периода культивирования (30-40 сут). Сначала отмечали рост корешка. На следующем этапе происходило вытягивание и окрашивание гипокотилия в зеленый цвет. Было установлено, что развитие соматических зародышей в условиях *in vitro* зависело от его морфологического типа.

Таблица 3

**Образование соматических зародышей клематиса на питательной среде МС,
дополненной зеатином**

Концентрация зеатина, мкМ	К-во эксплантов, образующих эмбриониды, %	К-во образовавшихся соматических зародышей / эксплант, шт.	
		2 недели	4 недели
контроль (0)	0	0	0
0,4	20 ± 2,7	0	4 ± 0
0,9	25 ± 7,3	2 ± 0	7 ± 0
1,8	80 ± 6,0	10 ± 3,1	25 ± 2,6
4,5	0	0	0

Наблюдения в процессе экспериментов позволили выявить 7 морфологических типов образовавшихся соматических зародышей клематиса: 1) односемядольный (эмбрионид формируется с одной семядолью, а вторая, чаще всего, недоразвита или полностью редуцирована); 2) двусемядольный (напоминает зиготический зародыш клематиса); 3) полисемядольный (образующийся и развивающийся эмбрионид имеет три и более семядолей); 4) трубчатый (семядоли эмбрионид срастаются между собой в виде трубы); 5) эмбрионид с вытянутым гипокотилем и практически редуцированными семядолями (семядоли зародыша очень узкие и в зоне эпикотилия апекс не выражен); 6) эмбрионид подобный зиготическому зародышу (внешнее сходство с зиготическим зародышем, однако развитие останавливается на этапе раскрытия семядолей, затем эмбрионид погибает); 7) эмбрионид, имеющий форму цветной капусты, семядоли которого очень сильно разрастаются и деформируются (рис. 3).

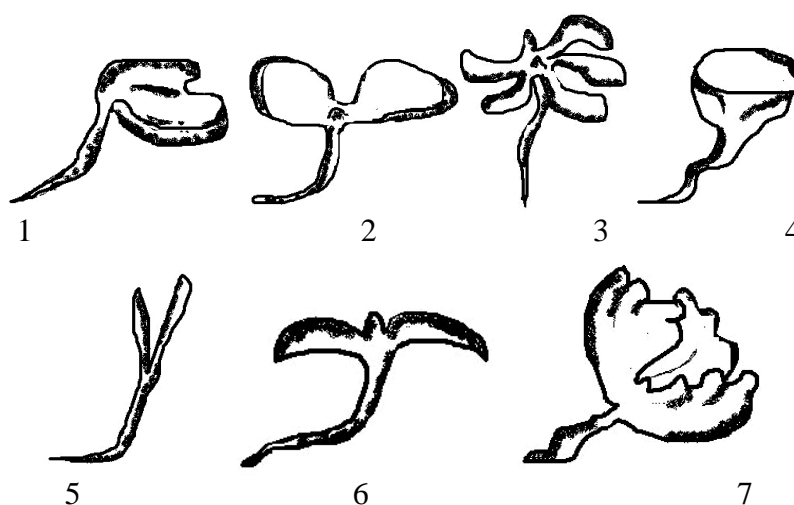


Рис. 3. Морфологические типы соматических эмбрионидов клематиса, сформированных в культуре *in vitro*: 1 – односемядольный; 2 – двусемядольный; 3 – полисемядольный; 4 – трубчатый; 5 – эмбрионид с вытянутым гипокотилем; 6 – эмбрионид, подобный зиготическому зародышу; 7 – эмбрионид, имеющий форму цветной капусты

При последующем культивировании всех типов соматических зародышей и эмбриоподобных структур было установлено, что только 4 морфологических типа эмбрионидов имели способность к регенерации растений – № 1-4.

При культивировании соматического зародыша чаще всего наблюдали одновременное прорастание побега и корня. Однако корни развивались более активно. Подобное нормальное развитие биполярных соматических зародышей отмечено рядом исследователей

и на других видах растений [11, 27-29, 42]. Характерной особенностью проростков клематиса было образование и рост 2-х корешков без ярко выраженных корневых волосков.

Последующие субкультивирование соматических зародышей на среду, содержащую 1,8 мкМ зеатина и различные концентрации ИМК, приводило к образованию вторичных эмбриоидов на поверхности уже сформированных и развивающихся соматических зародышей (табл. 4).

Таблица 4

Влияние концентрации ИМК на вторичный эмбриогенез клематиса

Концентрация ИМК, мкМ	К-во эмбриоидов, формирующих вторичные зародыши, %	К-во вторичных эмбриоидов / эксплант, шт.	
		2 недели	4 недели
контроль (0)	0	0	0
0,4	33 ± 1,7	3 ± 0,1	12 ± 0,1
0,9	95 ± 10	15 ± 2,7	30 ± 5,2
1,8	29 ± 1,2	2 ± 0,1	5 ± 0,1
4,5	10 ± 2,1	0	2 ± 0,1

В процессе эксперимента было установлено, что частота вторичного эмбриогенеза зависела от концентрации ИМК в питательной среде. Оптимальной оказалась концентрация 0,9 мкМ ИМК, при которой среднее количество эмбриоидов на эксплант составило 30±5,2 штук. Средний размер зародыша в начале семядольной стадии достигал 1,5±0,7 мм. На свету в течение 30 сут размер семядолей составил 4-5 мм. Образовавшиеся вторичные эмбриоиды легко отделялись друг от друга. Культивирование отделенных вторичных соматических зародышей показало, что если эмбриоид помещали в культуральный сосуд, он активно начинал развиваться и расти и на 30-45 сутки достигал размера 9-10 мм. Высокие концентрации ИМК угнетали рост эмбриоидов и значительно снижали частоту вторичного эмбриогенеза клематиса.

Наряду с этим, дополнительные соматические зародыши формировались на проростках, развивающихся из эмбриоидов в зоне между гипокотилем и эпикотилем. Эта зона, на наш взгляд, являлась центром индукции образования новых соматических зародышей (рис. 4).

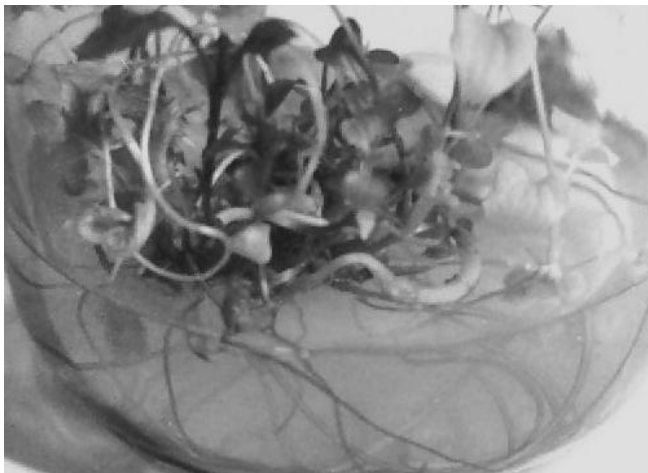


Рис. 4. Вторичный эмбриогенез клематиса сорта Серенада Крыма на питательной среде МС, дополненной 1,8 мкМ зеатина и 0,9 мкМ ИМК

Очень часто ученым не удается найти такой центр и поддерживать фазу образования зародышей на определенном уровне. Культивируя соматические зародыши клематиса на питательной среде МС, содержащей 1,8 мкМ зеатина и 0,9 мкМ ИМК, нам удалось поддерживать постоянное формирование эмбриоидов на протяжении 2-3 лет, снизив количество пассажей до 6-7 в год. Вторичные эмбриоиды, развиваясь в проростки, также в зоне между гипокотилем и эпикотилем формировали дополнительные соматические зародыши.

Роль интенсивности освещения и температуры в процессе непрямого соматического эмбриогенеза клематиса

В ряде работ было показано, что существует тесная взаимосвязь между действием качества света на растение и накоплением в нем отдельных гормонов и ингибиторов роста [8, 16]. Известно также, что оптимальная температура, при которой культивируются соматические зародыши большинства видов растений находится в пределах 21-25 °С [27, 28, 32].

Нами в процессе исследований было выявлено воздействие физических факторов на развитие соматических зародышей в каллусе клематиса. На рисунке 5 показано, что понижение и повышение температуры не влияет столь значительно на развитие эмбриоидов. Наилучший результат образования соматических эмбриоидов был получен при температуре 26°С. Количество соматических зародышей достигало $30 \pm 5,8$ штук на эксплант. Однако среди зародышей можно было наблюдать эмбриоиды на разных стадиях развития: от глобулярной до семядольной.

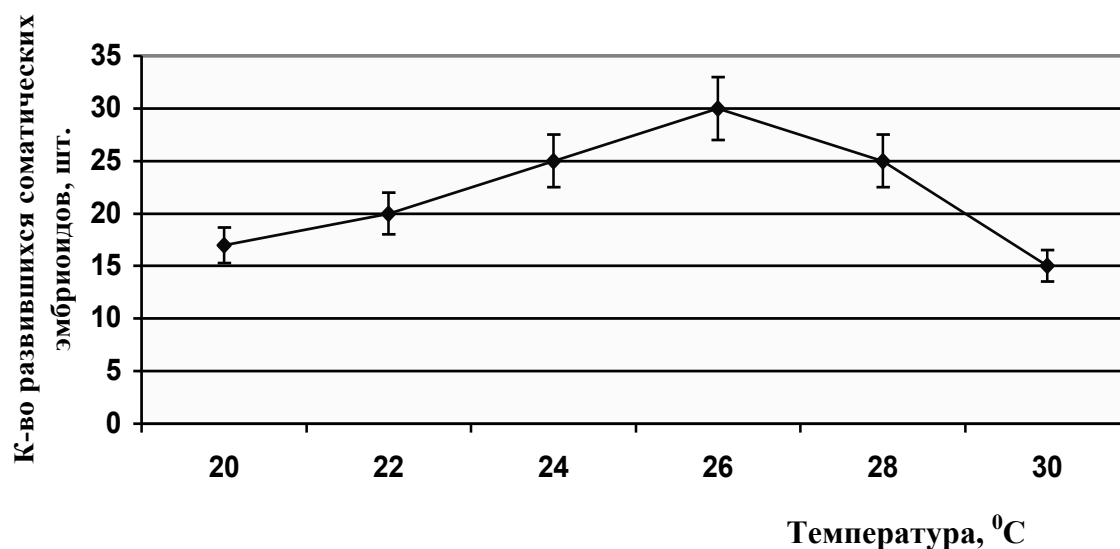


Рис. 5. Зависимость частоты образования соматических зародышей клематиса от воздействия температуры в процессе культивирования *in vitro*

В отличие от температуры, интенсивность освещения оказывала значительное влияние на частоту соматического эмбриогенеза. Уменьшение интенсивности освещения до $12,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ резко снижало частоту соматического эмбриогенеза (рис. 6). Определено оптимальное значение интенсивности освещения ($40 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), при котором количество развившихся эмбриоидов достигало 25-30 штук на эксплант. Все соматические зародыши имели ярко-зеленую окраску. Кроме того, было установлено, что 80% эксплантов, культивируемых при такой интенсивности освещения, имели компетентные клетки, способные образовывать незиготические зародыши.

Результаты экспериментов по влиянию интенсивности освещения на получение соматических зародышей клематиса значительно отличаются от таковых, проводимых на других культурах, так как обычно эмбриоиды образуются в темноте [12, 22, 24, 37, 40]. Это еще раз подтверждает необходимость тщательного изучения особенностей регенерации и подбора условий культивирования к каждому новому виду или сорту растений.

Таким образом, результаты, полученные в процессе экспериментов, позволили нам разработать способ непрямого соматического эмбриогенеза клематиса на примере сорта Серенада Крыма, состоящий из последовательных этапов, выполнение которых необходимо для получения полноценных растений клематиса.

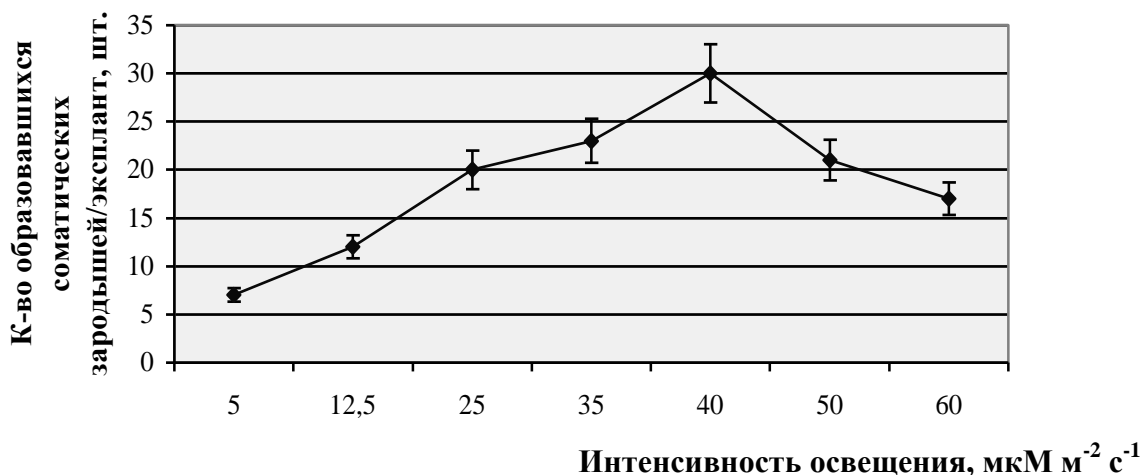


Рис. 6. Зависимость частоты соматического эмбриогенеза от влияния интенсивности освещения в процессе культивирования каллуса клематиса

В начале отбирались растения *in situ*, из которых вычленили меристему или вводили сегмент побега с почками в условия *in vitro*. Побег развивался и в его основании формировался каллус, этот каллус отделяли и помещали на питательную среду с зеатином для индукции образования эмбриогенных структур. Соматические зародыши образовывались в каллусе клематиса. Затем эмбриониды отделяли друг от друга и высаживали на среду для их прорастания. В зоне соединения гипокотилия и эпикотилия у развивающегося проростка образовывались дополнительные зародыши, и начинался прямой вторичный эмбриогенез. Частота вторичного эмбриогенеза не уменьшалась на протяжении 5-7 субкультивирований. Полученные растения адаптировали к условиям *in vivo*, а затем переносили в теплицу для дальнейшего доращивания. Нормально сформированные растения с мощной корневой системой высаживали в открытый грунт, где они зацветали сразу же, в первый год культивирования *in situ*. Весь цикл размножения клематиса через непрямой соматический эмбриогенез составил 1,5-2 года.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений: 35-е Тимиряз. чтен. – М.: Наука, 1975. – 50 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 242 с.
5. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
6. Донюшкина Е.А. Клематисы // Квіти України. – 1999. – № 10. – 72 с.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
8. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro* // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, № 4. – С.795-802.
9. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 730 с.
10. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: ПолиграфКонсалтинг, 2003. – 250 с.

11. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
12. Митрофанова И.В., Шевелуха В.С. Соматический эмбриогенез зизифуса (*Zizyphus jujube* Mill.) в культуре *in vitro* // Известия ТСХА. – 1995. – Вып. 1. – С. 120-127.
13. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
14. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высш. школа, 1960. – 205 с.
15. Риекстиня В.Э., Риекстиныш И.Р. Клематисы. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 287 с.
16. Уоринг Ф., Филипс И. Рост растений и дифференцировка. – М.: Мир, 1984. – 512 с.
17. Ahroni A., Zuker A., Rozen Y., Shejtman H., Vainstein A. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of *gypsophila* // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1997. – Vol. 49, N 2. – P. 101-106.
18. Ammirato P.V. Embryogenesis: Handbook of plant cell culture / Eds. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada. – New York: London: Macmillan, 1983. – Vol. 1. – P. 82-123.
19. Breton Ch., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., Jay-Allemand Ch. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of “Early Mature” walnut trees (*Juglans regia*) that flower *in vitro* // *Tree Physiology.* – 2004. – Vol. 24. – P. 425-435.
20. Carraway D.T., Merkle S.A. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut // *Can. J. For. Res.* – 1997. – Vol. 27. – P. 1805-1812.
21. Conde P., Loureiro J., Santos C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. // *Plant Cell Rep.* – 2004. – Vol. 22, N 9. – P. 632-639.
22. Dal Vesco L.L., Guerra M.P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* – 2001. – Vol. 64. – P. 19-25.
23. Dunstan D.I., Tautorus T.E., Thorpe T.A. Somaic embryogenesis in woody plants // *In Vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. T.A. Thorpe. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 471-538.
24. Fitch M.M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1993. – Vol. 32, N 2. – P. 205-212.
25. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 417-421.
26. Hamama L., Baaziz M., Letouze R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of *jojoba* // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* – 2001. – Vol. 65. – P. 109-113.
27. Han K.H., Park Y.G. Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) // *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – V. 5. – Great Britain: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 1999. – P. 149-161.
28. Jain S.M., Ishii K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
29. Litz R.E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees // *Tissue Culture in Forestry and Agriculture* / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin, A. Hollaender. – New York: Plenum Press, 1985. – P. 179-193.
30. Maheswaran G., Williams E.G. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro* // *Ann. Bot.* – 1985. – Vol. 56. – P. 619-630.
31. Mandegaran Z., Sieber V.K. Somatic embryogenesis in *Clematis integrifolia* x *C. viticella* // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2000. – Vol. 62, N 2. – P. 163-165.
32. Merkle S.A. Somatic embryogenesis in ornamentals // *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – P. 13-33.
33. Merkle S.A., Dean J.E. Forest tree biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11, N 3. – P. 298-302.
34. Mitrofanova I.V., Kin E.V., Mitrofanova O.V., Donushkina E.A. Obtaining of somatic embryos in tissue culture of *Clematis* L // *In vitro Plant Cell Biology, Biotechnology and*

Germplasm Preservation: Abst. VII Intl.Conf. (25-28 November 1997, Moscow, Russia). – Moscow, 1997. – P. 136.

35. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Pandei D.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujube* Mill. *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. – 1997. – Vol. 44, N 1. – P. 94-99.

36. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.

37. Oliveira M.M., Pais M.S.S. Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit) // *Plant Cell Rep.* – 1992. – Vol. 11. – P. 314-315.

38. Onay A. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.) // *Turk. J. Bot.* – 2000. – Vol. 24. – P. 91-95.

39. Pierik R.L.M. *Anthuriuml andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* // *Physiol. Plant.* – 1976. – V. 37. – P. 80-82.

40. Piven N.M., Barredo-Pool F.A., Borges-Argáez I.C., Robert N.L. Key events in the regulation of somatic embryogenesis in monocots: Agaves // *Bull. State Nikitsky Bot. Gardens.* – 2002. – N 86. – P. 12-16.

41. *Plant Cell, Tissue and Organ Fundamental Methods* / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Heidelberg: New York: Springer Verlag, 1995. – 360 p.

42. Salajova T., Salaj J., Kormutak A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. // *Plant Sci.* – 1999. – Vol. 145. – P. 33-40.

43. Souter M., Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis // *J. Exp. Bot.* – 2000. – Vol. 51. – P. 971-983.

**Indirect somatic embryogenesis of *Clematis* sp.
Mitrofanova I.V., Sokolov O.I., Yezhov V.N.**

The results of plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Clematis* have been represented. Influence of culture medium, phytohormone concentration, intensity of illumination and temperature on inducing of somatic embryos formation and developing has been determined.

**СОПРЯЖЕННОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЛОДОВ
СУБТРОПИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ – ЗИЗИФУС, ГРАНАТ И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ**

А.А.РИХТЕР, кандидат биологических наук;

Л.Т.СИНЬКО, кандидат сельскохозяйственных наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

В помологической коллекции субтропических растений Никитского ботанического сада генофонд зизифуса представлен 140 образцами сортов и форм, а разнообразие культуры граната охарактеризовано 370 сортами [17].

Селекционная работа с зизифусом направлена на создание урожайных, морозостойких растений, устойчивых к болезням и вредителям, дающих рано созревающие крупные плоды высоких вкусовых качеств и с большим содержанием биологически активных веществ [15].

В связи с этим, учитывая агроклиматические условия произрастания растений зизифуса (*Zizyphus jujuba* Mill.), в Крыму проводилось исследование биологических особенностей (фертильность пыльцы, засухо- и морозоустойчивость) его различных сортов и форм для внедрения в производство [4, 10-12].

Основные задачи селекции граната (*Punica granatum* L.) заключаются в создании зимостойких, с длительным периодом зимнего покоя растений, имеющих плоды раннего срока созревания, с высокими вкусовыми качествами, продолжительной лежкостью и транспортабельностью; мягкими семенами и повышенным содержанием сока с устойчивой, интенсивной антоциановой окраской, пригодными для длительного хранения и консервирования [15].

При изучении особенностей плодоношения граната, произрастающего в коллекции Никитского ботанического сада, уделялось внимание оценке самофертильности, урожайности, засухо- и морозостойкости в условиях Южного берега Крыма [1, 2, 8, 13, 14].

Цель настоящей работы – рассмотреть и обсудить взаимосвязь биохимических признаков плодов растений зизифуса, исследовать основные химические компоненты сока плодов различных сортов граната, их биологические и технологические особенности.

Материалы и методы

Работу проводили на различных образцах растений зизифуса обыкновенного (*Zizyphus jujuba* Mill.) и граната (*Punica granatum* L.), выращенных в коллекционных посадках Никитского ботанического сада на Южном берегу Крыма.

Отбор средних проб плодов, подготовку к анализу и определение их химического состава проводили общепринятыми методами [5, 9]. Содержание сухих веществ определяли гравиметрически, пектиновые вещества - фотоэлектроколориметрически с построением калибровочной кривой по галактуроновой кислоте, свободные органические кислоты - титрованием 0.1 н. NaOH с пересчетом по коэффициенту для яблочной кислоты (0,0067), количество сахаров определяли колориметрически по обесцвечиванию жидкости Фелинга, содержание аскорбиновой кислоты - иодометрически. Определение лейкоантоцианов (проантоцианидинов) осуществляли после их окисления в антоцианы. Экстракцию этих компонентов вели 1%-ной HCl в 96%-ном этаноле с последующим разведением кислым н-бутанолом (1:10). Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ Statistica – 5 [16].

Результаты и обсуждение

Зизифус

В таблице 1 приведены данные об изменении содержания основных химических компонентов плодов зизифуса в различные сезоны вегетации. Основываясь на представленных результатах, отметим, что для плодов этого растения характерно высокое содержание сухих веществ (26,1–38,2%) и углеводов (20,8–36,6% от сырого вещества). В суммарном комплексе сахаров преобладают моносахариды (16,1–30,4%). Содержание титруемых органических кислот в разные годы достигало 0,44–1,80% и соответствовало типичным данным для плодов других косточковых растений (абрикос, алыча, нектарин, персик).

В плодах практически всех изученных сортов зизифуса отмечено высокое содержание аскорбиновой кислоты (235-689 мг / 100 г) и лейкоантоцианов (176-590 мг / 100 г сырой массы тканей). Известно, что флавоноиды (лейкоантоцианы) не токсичны и обладают Р-витаминной активностью [3]. Таким образом, в плодах зизифуса в довольно высоких концентрациях присутствуют витамины С и Р, которые в организме человека выполняют роль активных адаптогенов.

Суммарное содержание пектиновых веществ достигало 0,78 ('Китайский 48') - 2,21% ('Вахшский 45-2') и варьировало в разные годы у сорта Вахшский 40-5 в пределах 0,79-1,13% для водорастворимого пектина и 0,60-0,94% – для протопектина.

Ранее было показано [9], что корреляционные зависимости между основными биохимическими признаками позволяют прогнозировать изменение содержания химических компонентов в плодах в результате селекции косточковых плодовых растений. Например, для плодов сортов зизифуса наблюдается прямая зависимость между накоплением сухих

веществ, с одной стороны, и содержанием сахарозы ($r = 0,07-0,69^{**}$) или суммы углеводов ($r = 0,44-0,73^{**}$) - с другой. Таким образом, создавая сорта с повышенным содержанием углеводов можно получить образцы, характеризующиеся высоким содержанием сухих веществ, перспективные для переработки на сухофрукты или цукаты.

Таблица 1

Химический состав плодов зизифуса в разные годы вегетации

Признак	Сорт								
	Вахшский 40-5			Вахшский 45-2			Китайский 48		
	1979	1980	1984	1979	1980	1984	1980	1981	1983
масса плода, г	13,1	11,6	18,7	37,0	37,6	83,2	48,4	27,2	26,8
сухое вещество, %	28,0	26,1	30,1	37,4	34,4	38,2	30,0	34,2	37,1
моносахариды, %	16,1	17,8	22,4	23,0	23,5	30,4	21,2	17,7	26,0
сумма сахаров, %	21,0	20,8	26,0	29,6	26,3	36,6	23,7	27,2	30,6
титруемые кислоты, %	1,62	1,80	1,39	0,82	0,72	0,44	0,49	1,00	1,14
аскорбиновая кислота, мг/100г	593	655	440	465	235	510	444	445	507
лейкоантоцианы, мг/100г	339	354	200	432	590	176	194	405	200
водорастворимый пектин, %	1,13	0,79	0,87	1,41	0,59	0,61	0,52	0,39	0,70
протопектин, %	0,64	0,94	0,60	0,80	0,99	0,92	0,60	0,39	0,68

Для плодов зизифуса характерно высокое содержание аскорбиновой кислоты и лейкоантоцианов, что обуславливает их поливитаминные свойства. В связи с этим отметим, что между содержанием сухих веществ в плодах и количеством лейкоантоцианов (Р-активных веществ) в течение ряда лет прослеживается положительная зависимость ($r = 0,05-0,66^{**}$), тогда как связь с уровнем содержания аскорбиновой кислоты (витамин С) в разные годы исследований имела противоречивую направленность и в течение 3-х из 5 лет была недостоверной.

Для плодов зизифуса типично высокое содержание моносахаридов и их преобладание над сахарозой [7]. Аналогичная тенденция выявлена и в наших опытах (табл. 1). Наряду с этим отметим, что содержание моносахаридов и сахарозы в плодах изученных сортов зизифуса связано отрицательной зависимостью ($r = -0,38 - -0,66^{**}$), тогда как связь с суммарным количеством сахаров была, как правило, положительной ($r = 0,26-0,74^{**}$). Прямая корреляция между содержанием моносахаридов и сахарокислотным индексом ($r = 0,33-0,78^{**}$) (-0,21) и обратная с отношением сахара/моносахариды ($r = -0,53^* - -0,86^{**}$) отличают сахарокислотный комплекс плодов зизифуса от такового в плодах персика, алычи и других косточковых растений.

Содержание сахарозы положительно коррелирует с общей сахаристостью плодов ($r = 0,10-0,80^{**}$) и с отношением сахара/моносахариды ($r = 0,74^{**} - 0,98^{**}$). В то же время корреляция между суммой сахаров и сахарокислотным индексом, хоть и была положительной в течение ряда лет, но имела достоверно значимый уровень лишь за 2 года из 5 ($r = 0,08 - 0,66^{**}$).

В плодах зизифуса наблюдается прямая корреляция между содержанием аскорбиновой кислоты и органическими кислотами ($r = 0,25 - 0,68^{**}$) (-0,13). Кроме того, содержание аскорбиновой кислоты положительно связано с суммарным количеством пектинов ($r = 0,06 - 0,62^{**}$) (-0,44). Эти зависимости имели положительную направленность в течение 4-х из 5 лет и их, вероятно, следует учитывать в селекции этой культуры.

Характеризуя вкусовые особенности плодов зизифуса отметим, что содержание органических кислот в них прямо связано с содержанием лейкоантоцианов ($r = 0,18 - 0,54^*$)

(-0,49), водорастворимого пектина ($r = 0,01 - 0,74^{**}$), протопектина ($r = 0,26 - 0,66^{**}$) и их суммы ($r = 0,16 - 0,66^{**}$), тогда как с сахарокислотным индексом прослеживается четкая отрицательная зависимость ($r = -0,78^{**} - -0,92^{**}$).

Содержание водорастворимого пектина положительно коррелирует с содержанием протопектина ($r = 0,21 - 0,86^{**}$), суммы пектинов ($r = 0,64^{**} - 0,96^{**}$) и отрицательно - с сахарокислотным показателем ($r = -0,09 - -0,72^{**}$). Между уровнем протопектина и суммой пектиновых веществ отмечена достоверная прямая связь ($r = 0,57^{*} - 0,97^{**}$), тогда как общее содержание пектинов с сахарокислотным индексом взаимосвязано отрицательно ($r = -0,26 - -0,67^{**}$) ($0,50^{**}$).

Рассматривая взаимосвязь признака «масса плода» с изученными биохимическими признаками, отметим её отрицательную корреляцию с сахарозой ($r = -0,10 - -0,56^{*}$), с отношением сахара/моносахариды ($r = -0,08 - -0,67^{**}$) и положительную с сахарокислотным показателем ($r = 0,17 - 0,62^{**}$).

Принимая во внимание то, что отмеченные зависимости имеют отношение к формированию вкусовых оттенков плодов и достигают достоверных значений в течение 3-4 лет из 5, то, очевидно, что их целесообразно учитывать в дальнейшей селекции этой культуры.

Например, если вести селекцию на крупноплодность, то среди гибридных форм можно получить образцы с плодами, обедненными содержанием органических кислот, но с повышенным сахарокислотным индексом, что, вероятно, положительно отразится на их вкусовых достоинствах.

Если селекцию вести на обогащение плодов суммарным содержанием углеводов, то в создаваемых образцах можно ожидать увеличение содержания сухих веществ, моносахаридов, сахарозы и сахарокислотного индекса, что также благоприятно отразится на вкусе плодов.

Ведя селекцию на повышенное содержание витамина С (аскорбиновой кислоты) в плодах, можно получить формы, обогащенные другими органическими кислотами, протопектином, но с пониженным сахарокислотным индексом, в связи с чем во вкусовой гамме оттенков будут преобладать кисло-сладкие тона.

В том случае, когда отбор будет вестись на повышенное содержание витамина Р (лейкоантоцианов), можно ожидать получение форм с повышенным содержанием сухих веществ, но обеднённых пектиновым комплексом компонентов.

Гранат

При сопоставлении данных о содержании биохимических компонентов в соке плодов граната в различные сезоны вегетации, прослеживается хорошая воспроизводимость результатов исследований (табл. 2).

Для светлоокрашенного сока плодов большинства сортов граната (табл. 3) при преобладании моносахаридов над дисахаридами характерно довольно низкое содержание органических кислот от 0,37% (Гей Ширин Нар) до 4,18% (Бумажный 2421). Содержание аскорбиновой кислоты достигало 1,4-12,3 мг/100 г (сорта Дк-10 и Иран 29-3, соответственно), а содержание лейкоантоцианов было, как правило ниже чем антоцианов – 8 мг / 100 г и 308, 276, 167 мг / 100 г ('Вургун', 'Дк-10', 'Агдамский 2').

Для темноокрашенного сока плодов граната (табл. 3) характерно преобладание моносахаридов от 7,5 ('Гюлоша 1680') до 11,8% ('Крымский Розовый') над сахарозой, при общей сахаристости, достигающей 8,3 ('Гюлоша 1680') - 12,9% ('Закатальский 5', 'Иран 3-7', 'Каим Нар'). Содержание органических кислот варьировало от 1,34 ('Иран 3-7') до 4,29% ('Кармен Ширин'), а аскорбиновой кислоты от 1,5 ('Афганский Мягкосемянный') до 15,4 мг/100 г ('Кизил Атрекский 13-2'). Количество лейкоантоцианов колебалось от 2 у ряда сортов (Ал Ширин Нар, Калифорнийский Красный, Мелес, Осенний, Афганский 18-4, Гюлоша Армянская, Мелес 4, Нухинский Красный) до 160 мг / 100 г (Смородиновый 6/57), а антоцианов – от 352 (Нухинский Красный) до 748 мг / 100 г (Крымский Розовый).

Ранее было показано, что антоцианы сока плодов граната состоят из цианидин-3-глюкозида, цианидин-3,5-диглюкозида, дельфинидин-3-глюкозида и дельфинидин-3,5-диглюкозида. Наряду с этим было высказано мнение о том, что одной из основных причин выпадения осадка в соке является повышенное содержание в нем лейкоантоцианов [6].

Таблица 2

Содержание химических компонентов гранатового сока в разные годы вегетации

Сорт	Год	Моно-	Сумма	Органи-	Аскор-	Лейко-	Анто-
		сахари-	сахар-	ческие	биновая	анто-	циа-
		ды	ров	.кислоты	кислота	цианы	ны
		%			мг/100 г		
Агдамский Красный	1987	8,5	9,1	2,68	10,4	91	576
Агдамский Красный	1989	9,3	9,9	3,36	13,2	28	412
Алма Нар	1985	11,7	13,1	2,87	9,9	80	132
Алма Нар	1987	10,0	10,3	2,70	7,0	24	136
Бала Мюрсаль	1985	10,6	11,2	2,97	9,3	332	766
Бала Мюрсаль	1987	10,0	12,1	3,69	12,5	179	748
Бедана Дашнабадска	1985	11,7	12,3	2,52	9,5	26	149
Бедана Дашнабадска	1987	10,0	10,5	3,25	8,6	16	202
Вашингтонский	1984	13,9	14,2	0,45	5,4	47	119
Вашингтонский	1985	12,6	12,8	0,47	5,2	19	182
Калифорнийский	1985	9,8	10,4	3,59	13,3	51	176
Калифорнийский	1987	8,9	9,7	3,69	10,3	50	128
Кардаш	1987	11,4	12,7	2,49	8,1	25	528
Кардаш	1989	10,9	11,6	0,46	5,4	90	369
Крымский 5	1987	9,3	11,3	2,56	3,6	32	744
Крымский 5	1989	9,1	10,2	2,62	7,0	13	440
Мардакянский Красный	1985	8,0	8,5	2,42	3,5	147	440
Мардакянский Красный	1989	1,6	19,8	2,64	11,1	24	418
Милекеш 4457	1984	17,7	18,0	0,39	6,4	167	234
Милекеш 4457	1987	13,6	14,8	0,41	1,6	47	209
Сурх Анор Красный	1984	12,8	13,3	2,76	11,8	77	150
Сурх Анор Красный	1985	11,2	11,5	2,25	9,2	45	185
Шааргузский	1985	9,7	10,1	2,48	11,3	252	458
Шааргузский	1989	9,9	11,6	2,95	10,2	147	378

Для сока плодов различных сортов граната характерно существование тесных взаимосвязей между сахарами и кислотами. Например, содержание моносахаридов прямо связано с общей сахаристостью ($r = 0,87^{**}-0,96^{**}$) и сахарокислотным индексом ($r = 0,38-0,65^{**}$), тогда как с количеством титруемых кислот зависимость отрицательная ($r = -0,26 - -0,61^{**}$).

Сахароза прямо коррелирует с суммой сахаров ($r = 0,30-0,97^{**}$) и отношением сахароза/монозы ($r = 0,72^{**}-0,99^{**}$). Общая сахаристость гранатового сока положительно связана как с сахарокислотным коэффициентом ($r = 0,31-0,64^{**}$), так и с отношением сахароза/монозы ($r = 0,03-0,95^{**}$). Содержание аскорбиновой кислоты положительно коррелирует с титруемой кислотностью ($r = 0,22-0,75^{**}$) и отрицательно с сахарокислотным индексом ($r = -0,12 - -0,77^{**}$). Количество титруемых органических кислот обратно

пропорционально связано с отношением сахаров к кислотам ($r = -0,84^{**} - -0,90^{**}$) и положительно коррелирует с содержанием антоцианов ($r = 0,34^{*}-0,48^{**}$).

Таблица 3

Содержание химических компонентов гранатового сока в плодах различных сортов (1984-1989 гг.)

Сорт	Моно-сахариды	Сумма сахаров	Органические кислоты	Аскорбиновая кислота	Лейкоантоцианы	Антоцианы
	%			мг/100г		
образцы со светлой окраской сока						
Агдамский 2	8,7	11,3	3,78	9,2	8	167
Ак-Дона	11,7	12,3	0,53	6,2	96	255
Бедана 12/3	9,9	10,3	0,65	3,6	112	290
Бумажный 2421	12,1	14,5	4,18	6,1	20	172
Вургун	9,5	10,8	4,07	11,2	8	308
Гей Ширин 10/8	10,6	13,4	0,37	1,5	92	184
Гей Ширин 667	11,4	12,4	0,41	1,8	32	163
Гей Ширин Нар	12,0	12,7	0,37	2,1	58	110
Гибрид 6	12,0	12,7	0,41	2,6	9	264
Гюлоша	10,0	11,3	3,17	9,6	30	220
Денаусский 176	9,8	10,4	2,75	8,5	44	145
Дк – 10	11,1	11,3	0,48	1,4	8	276
Зариф Нар	10,9	12,1	0,42	4,4	16	110
Зебейда	10,0	11,6	3,64	10,9	22	147
Иран 29-3	11,2	13,3	0,42	12,3	57	229
образцы с темной окраской сока						
Ал Ширин Нар	8,4	9,1	2,44	10,5	2	418
Афганский 18-4	10,7	11,2	2,72	12,0	2	581
Афганский Мягкосемян.	11,3	12,1	1,43	1,5	16	484
Гюлоша 1680	7,5	8,3	1,78	11,4	48	396
Гюлоша Армянская	9,6	9,9	2,82	7,9	2	422
Закатальский 5	11,7	12,9	2,90	6,6	24	660
Иран 3-7	11,7	12,9	1,34	6,2	31	493
Каим Нар	11,7	12,9	3,00	11,6	138	660
Калифорнийский	9,8	10,0	3,43	12,8	2	572
Кармен Ширин	7,8	9,7	4,29	12,4	70	704
Кзыл Пучак	8,8	9,1	2,88	3,6	85	378
Кизил Атрекский	10,2	11,2	2,47	15,4	83	383
Крымский Розовый	11,8	12,4	3,12	12,4	66	748
Мелес	9,5	10,3	3,14	10,0	2	528
Мелес 4	10,2	11,1	2,23	3,5	2	550
Миляси	10,2	11,2	2,74	11,1	32	374
Нухинский Красный	10,8	12,5	3,63	12,7	2	352
Осенний	9,3	10,0	3,00	8,4	2	616
Салаватский	10,6	11,3	2,50	10,5	45	616
Смородиновый 6/57	9,6	9,8	2,50	7,4	160	634

Признак «масса плода» с описываемыми биохимическими характеристиками устойчивых достоверных корреляционных зависимостей не проявляет. Следовательно, селекция крупноплодных форм и сортов граната может проводиться, независимо от уровня накопления сахаров, кислот и фенолов в них.

Ведя селекцию на обогащение плодов суммарным содержанием углеводов, можно ожидать получение образцов с повышенным содержанием сахарозы и сахарокислотного индекса сока плодов.

Обогащение сока плодов витамином С (аскорбиновой кислоты) приведет к увеличению содержания других органических кислот и снижению сахарокислотного коэффициента. В то же время ведя селекцию на повышенное содержание органических кислот, можно получить формы с яркой антоциановой окраской сока и пониженным сахарокислотным индексом.

Выводы

1. Селекция растений зизифуса на повышенное содержание сухих веществ в плодах приведет к увеличению их сахаристости и Р-витаминной активности за счет повышения содержания лейкоантоцианов. Отбор форм с повышенным содержанием органических кислот будет сочетаться с обогащением их пектинами и уменьшением сахарокислотного индекса.

2. Селекция растений граната на повышенную сахаристость сока плодов положительно связана с накоплением моносахаридов, сахарозы и сахарокислотным показателем. Обогащение плодов аскорбиновой кислотой приведет к накоплению других органических кислот и снижению сахарокислотного коэффициента. Увеличение титруемой кислотности сока плодов обусловит снижение сахарокислотного индекса и увеличение содержания антоцианов.

Список литературы

1. Арндт Н.К. Особенности биологии плодоношения граната // Бюл. Никит. ботан. сада. – 1968. – Вып. 1 (7). – С. 32-36.
2. Арндт Н.К. Фертильность генеративных органов у сортов граната в Крыму // Труды Никит. ботан. сада. – 1980. – Т. 80. – С. 82-109.
3. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. - М.: Мир, 1986. – 422 с.
4. Вильде Э.И. Использование агроклиматических показателей при изучении и районировании сортов субтропических плодовых и орехоплодных культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1983. – Т. 90. – С. 91-96.
5. Кривенцов В.И. Методические рекомендации по анализу плодов на биохимический состав. – Ялта, 1982. – 22 с.
6. Кривенцов В.И., Арндт Н.К. Антоцианы сока плодов граната // Труды Никит. ботан. сада. – 1981. – Т. 83. – С. 110-116.
7. Кругляков Г.Н. Состав сахаров плодов унаби // Известия Вузов СССР. Пищевая технология. – 1973. – № 5. – С. 143-145.
8. Кучерова Т.П., Синько Л.Т. Основные процессы жизнедеятельности некоторых сортов граната в связи с их устойчивостью к экстремальным условиям года // Труды Никит. ботан. сада. – 1983. – Т. 90. – С. 68-75.
9. Рихтер А.А. Использование в селекции взаимосвязей биохимических признаков // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 121-130.
10. Романова Г.С., Синько Л.Т., Литвинова Т.В. Характеристика пыльцы различных сортов зизифуса // Бюл. Никит. ботан. сада. – 1985. – Вып. 58. – С. 54-60.
11. Синько Л.Т. Зизифус – одна из ценнейших субтропических плодовых пород на юге Советского Союза // Труды Никит. ботан. сада. – 1971. – Т. 52. – С. 31-53.
12. Синько Л.Т. Агробиологическая характеристика зизифуса в Крыму // Труды Гос. Никит. ботан. сада. – 1977. – Т. 73. – С. 98-125.
13. Синько Л.Т. Особенности плодоношения различных сортов граната в Крыму // Труды Никит. ботан. сада. – 1983. – Т. 90. – С. 51-58.
14. Синько Л.Т., Кучерова Т.П. Устойчивость различных сортов граната к зимним неблагоприятным условиям // Труды Никит. ботан. сада. – 1980. – Т. 80. – С. 56-81.
15. Шолохова В.А., Синько Л.Т., Казас А.Н. Селекция субтропических плодовых культур // Садоводство. – 1983. – № 4. – С. 25-27.

16. Электронный учебник по статистике. М.: StatSoft, Inc. (1999). WEB: <http://www.statsoft.ru/textbook/default.htm>.

17. Yezhov V.N., Smykov A.V., Smykov V.K., Khokhlov S.Y., Saurov D.E., Mehlenbacher S.A., Molnar T.J., Goffreda J.C., Funk C.R. Genetic resources of temperate and subtropical fruits and nut species at the Nikita botanical gardens // HortScience. – 2005. – Vol. 40, N 1. – P. 5-9.

Biochemical characters of subtropical fruits - zhizhiphus, pomogranate and their use in selection

Richter A.A., Sinko L.T.

The links of biochemical characters in zhizhiphus and pomogranate fruits have been discussed. It is shown, that the selection of these plants on the increasing of dry substances in fruits leads to the increasing of sugar ($r = 0.44-0.73^{**}$) and vitamin P ($r = 0.53^{**}-0.66^{**}$). The selection of forms with high content of titratable organic acids will combine with increasing pectines ($r = 0.45-0.66^{**}$) and decreasing of sugar-acid index. The selection of pomogranate on high content of sugar in juice is positively connected with accumulation of monosaccharides ($r = 0.87^{**}-0.92^{**}$), saccharose ($r = 0.30-0.97^{**}$) and attitude of sugar to acid ($r = 0.31-0.64^{**}$). The increasing of vitamine C in fruits directly correlates with content of titratable organic acids ($r = 0.22-0.75^{**}$), but leads to the decreasing of sugar-acid index ($r = -0.84^{**}-0.90^{**}$), and can limit the increasing of anthocyanins content ($r = 0.34^{**}-0.62^{**}$).

ОЗДОРОВЛЕНИЕ СОРТОВ ВИШНИ (*PRUNUS CERASUS* L.) И СЛИВЫ (*PRUNUS DOMESTICA* L.) ОТ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ

Л.А. ЛУКИЧЕВА, кандидат биологических наук;
О.В. МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук;
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Одним из сдерживающих факторов развития современного садоводства является поражение плодовых культур вирусной инфекцией [5, 13]. В комплексе мероприятий по борьбе с вирусными болезнями, наряду с приемами ранней и точной диагностики, позволяющими оценить состояние растения, своевременно выявить и выбраковать пораженные, отобрать здоровые маточные экземпляры, важное место занимают биотехнологические приемы оздоровления и получения безвирусного посадочного материала. Результаты визуального обследования и экспериментальной проверки на выявление вирусных болезней в Крыму и ряде других регионов Украины в последние годы показали высокий уровень зараженности ценных промышленных и новых перспективных сортов косточковых плодовых культур вирусами [1, 14, 16]. Наиболее распространенными и вредоносными среди вирусов косточковых плодовых культур, в том числе вишни и сливы, являются вирусы некротической кольцевой пятнистости (*Prunus necrotic ringspot virus* - PNRSV), карликовости сливы (*Prune dwarf virus* - PDV) и шарки сливы (*Plum pox potyvirus* - PPV) [14, 15].

В связи с этим, целью исследований была разработка биотехнологических приемов оздоровления растений вишни и сливы, пораженных вирусной инфекцией.

Материалы и методы

Работа выполнена в отделе биотехнологии Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ). Объектами исследования служили пораженные вирусами растения сортов вишни (*Prunus cerasus* L.): Эрди Ботермо, Подбельская, Чернокорка,

Короска и сливы (*Prunus domestica* L.): Стенлей, Гвардейская Синяя, Персиковая, Венгерка Юбилейная.

В экспериментальной работе использовали как общепринятые методы вирусологических и биотехнологических исследований [2, 4, 12, 13], так и разработанные или модифицированные нами применительно к конкретной цели и задачам опытов. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки и верхушки активно растущих побегов вишни и сливы, отобранные с предварительно протестированных на вирусы растений.

Тестирование и ретестирование на вирусы исходного и оздоровленного посадочного материала выполняли по общепринятым модельным схемам с использованием стандартного набора растений-индикаторов [5, 13, 22], и серологически (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay) [3, 20, 23]. При выявлении состава вирусов в пораженных деревьях вишни и сливы использовали травянистые: *Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. foetidum* Schrad., *Cucumis sativus* L. 'Delikatess', *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L. и древесные: *Prunus serrulata* Lindl. 'Shirofugen' растения-индикаторы. Для повышения эффективности механической передачи вирусной инфекции на травянистые растения-индикаторы инокулюм готовили в 0,1М фосфатном буфере Серенсена pH 7,0 с вирусстабилизирующими добавками (0,2% сульфит натрия, 0,2% аскорбиновая кислота, 0,01М диэтилдитиокарбамат натрия, 1% кофеин); в 0,01М буфере Трис/HCl pH 8,5 (0,005М MgSO₄, 0,1% Na₂SO₃, 0,1% аскорбиновая кислота, 1% кофеин) и в 0,1М боратном буфере pH 8,0. В качестве инокулюма использовали лепестки цветков, почки и листья. Растения огурцов (*Cucumis sativus* 'Delikatess') и тыквы (*Cucurbita maxima* 'Melone') инфицировали в фазе семядольных листьев. На древесном индикаторе *Prunus serrulata* 'Shirofugen' применяли массивную инокуляцию индикатора способом окулировки 4-8 почками (глазками) с испытуемого образца.

В качестве основных методов исследований при разработке биотехнологических приемов оздоровления сортов вишни и сливы от вирусов использовали культуру органов и тканей, термотерапию и хемотерапию [6-8, 11, 13, 20]. Базовой средой была агаризованная среда МС (Murashige, Skoog, 1962) [21], на основе которой были разработаны 3 состава сред (МС-1, МС-2, МС-3) для определенного этапа морфогенеза. В качестве индуктора образования адвентивных почек и микропобегов использовали 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации от 1,11 до 6,66 мкМ.

Оздоровление растений от вирусной инфекции проводили сочетанием методов культуры органов и тканей и термотерапии *in vitro* или культуры органов и тканей и хемотерапии *in vitro*. При термотерапии *in vitro* культуральные сосуды с микропобегами и регенерантами помещали в термокамеру. В термокамере обеспечивали 16-часовой фотопериод с температурой 27-37 °С и интенсивностью освещения 2,5 клк. Экспозиция термотерапии составляла от 10 до 40 суток. Хемотерапию проводили с использованием ингибиторов вирусов – вироцидов: виразола (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) в концентрациях 1-50 мг/л и НЕО-ДНТ (2,4-диоксогексагидро-1,3,5-триазин) в концентрациях 50-100 мг/л путём непосредственного введения их в питательные среды.

Результаты и обсуждение

Высокая степень поражения сортов вишни и сливы прежде всего вызвала необходимость идентификации наиболее распространенных и вредоносных вирусов. В результате тестирования 4 сортов вишни и 4 сортов сливы удалось выявить 7 вирусов, из которых наиболее вредоносными являются Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) и Plum pox potyvirus (PPV). Учитывая это, для оздоровления пораженных сортов в систему оздоровления были включены методы культуры органов и тканей, термотерапии и хемотерапии *in vitro*.

Культивируемые *in vitro* экспланты вишни сортов Чернокорка, Подбельская, Эрди Ботермо, Короска и сливы сортов Персиковая, Стенлей, Венгерка Юбилейная, Гвардейская Синяя были поражены вирусами карликовости сливы (PDV) и

некротической кольцевой пятнистости косточковых культур (PNRSV). Достоверность наличия этих вирусных инфекций подтверждена методами тестирования на травянистых (*Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. foetidum* Schrad., *Cucumis sativus* L. 'Delikatess', *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L.) и древесных (*P. serrulata* Lindl. 'Shirofugen') растениях-индикаторах, наряду с этим вирус шарки (PPV) был обнаружен методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Определены сроки введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*: вегетативные почки – февраль-март; верхушки активно растущих побегов – июнь. Определенные трудности вызвало получение асептической культуры первичных эксплантов. Разработанные в отделе биотехнологии и вирусологии растений НБС-НИЦ режимы ступенчатой стерилизации для вегетативных почек оказались более эффективными [12]. Для активно растущих верхушек побегов положительные результаты получены при стерилизации в растворах 70%-ного этанола в течение 1 мин, 2,2%-ного Domestos в течение 6-8 мин с последующей 4-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой.

На основе базовой питательной среды МС разработаны три модификации питательных сред МС-1, МС-2 и МС-3 с учетом особенностей морфогенеза вишни и сливы. При введении в культуру *in vitro* первичных эксплантов более активное развитие наблюдали на питательной среде МС-1, дополненной БАП в концентрации 2,22 мкМ, ИМК – 1,23 мкМ, тиамином – 7,4 мкМ, мезоинозитом - 555,1 мкМ, и аскорбиновой кислотой – 208 мкМ. На 7-9 сутки культивирования отмечено начало развития эксплантов у вишни сорта Эрди Ботермо. Для индукции образования адвентивных почек и микропобегов лучшей была питательная среда МС-2, в которой в качестве индуктора использовали БАП в концентрации 2,22 мкМ для генотипов вишни и 6,66 мкМ для генотипов сливы. Коэффициент размножения микропобегов увеличивался и достигал максимальной величины в пятом пассаже. Так, у вишни сорта Эрди Ботермо он был выше и составил в среднем 1:13, у сорта сливы Стенлей – 1:15. Нормально развитые микропобеги вишни и сливы укореняли на питательной среде МС-3, которая содержала ½ состава макро- и микросолей по прописи МС и различные концентрации и соотношения веществ ауксинового типа действия. Оптимальной для укоренения была питательная среда МС-3, дополненная ИМК в концентрации 19,6 мкМ. Ризогенез у генотипов вишни отмечен на 20 сутки культивирования с образованием в среднем 1-2 корня/микропобег, в то время как у сливы – на 28 сутки с образованием 2-3-х корней/микропобег. При этом в процессе эксперимента установлено, что ризогенез был успешным в том случае, когда длина микропобегов была не менее 2 см. Процент укорененных микропобегов составил, в среднем, у сортов вишни 65,0±2,4%, сливы – 61,0±2,8%.

При термотерапии в условиях *in vitro* использовали микропобеги и регенеранты 4 сортов вишни и 4 сортов сливы. Показано, что недельная преадаптация является необходимым условием прохождения термотерапии, что повышает жизнеспособность эксплантов (вначале их выдерживали при температуре 27 °С, и затем её постепенно повышали на 2 °С, доводя до 37±1 °С). Установлено, что термотерапию вишни и сливы *in vitro* следует проводить при температуре 37±1 °С, понижая ее в ночное время на 10 °С для лучшей жизнеспособности растений, что согласуется с литературными данными [8, 19]. Как показали наши исследования, экспозиция термотерапии в условиях *in vitro* составляет 20-40 суток в зависимости от термостойкости вируса, термотолерантности культуры, типа экспланта, генотипа донорного растения.

Доказано, что один и тот же вирус в разных растениях-хозяевах может неодинаково реагировать на изменение температуры [17]. При одном и том же режиме термотерапии выявлено различие в продолжительности оздоровления вишни и сливы. Результаты ретестирования показали оздоровление вишни от вируса некротической кольцевой пятнистости (PNRSV) на 100% при экспозиции термотерапии 20 суток и оздоровление от

вируса карликовости (PDV) на 100% при экспозиции 40 суток. Несмотря на увеличение продолжительности термотерапии сливы, пораженной вирусом карликовости (PDV) до 40 суток, удалось оздоровить лишь 70% регенерантов (табл. 1).

Исследованиями показано, что для оздоровления сортов вишни и сливы с применением метода термотерапии *in vitro* целесообразно использовать регенеранты, так как микропобеги не выдерживают данный режим и погибают. Установлена зависимость жизнеспособности регенерантов от экспозиции термотерапии (табл. 2) и генотипа исходного растения. Так, среди сортов вишни более жизнеспособными оказались сорта Эрди Ботермо (90,9%) и Коросска (71,4%), а среди сортов сливы – Стенлей (66,7%) и Гвардейская Синяя (57,1%) (рис. 1, 2). Регенеранты сортов Чернокорка, Подбельская и сливы сортов Персиковая и Венгерка Юбилейная постепенно замедляли рост и формировали укороченные междоузлия. При этом отмечали изменение окраски листьев (хлороз) и их опадение, особенно это было выражено у сортов сливы.

Таблица 1

Результаты термотерапии *in vitro* вишни сорта Подбельская и сливы сорта Персиковая

Вирусы	Количество безвирусных растений / общее количество тестируемых растений (%) при различных экспозициях термотерапии			
	Контроль	20 сут	30 сут	40 сут
Подбельская				
PNRSV	0/21 (0)	19/19 (100)	14/14 (100)	10/10 (100)
PDV	0/21 (0)	8/19 (42,1)	9/14 (69,3)	10/10 (100)
Персиковая				
PNRSV	0/21 (0)	10/16 (62,5)	14/14 (100)	10/10 (100)
PDV	0/21 (0)	3/16 (18,7)	6/14(42,9)	7/10 (70)

Таблица 2

Жизнеспособность микропобегов и регенерантов вишни и сливы в зависимости от экспозиции термотерапии в условиях *in vitro*

Генотип	Жизнеспособность при различных экспозициях термотерапии, %							
	микропобеги				регенеранты			
	10 сут	20 сут	30 сут	40 сут	10 сут	20 сут	30 сут	40 сут
Вишня								
Эрди Ботермо	95,2	80,9	42,9	4,7	100	85,7	85,7	80,9
Коросска	95,2	76,2	28,6	0	100	85,7	80,9	71,4
Подбельская	85,7	66,7	9,5	0	95,2	90,5	66,7	47,6
Чернокорка	80,9	47,6	4,7	0	90,5	71,4	57,1	38,1
Слива								
Стенлей	95,2	57,1	14,3	0	95,2	85,7	85,7	66,7
Гвардейская Синяя	95,2	47,6	4,7	0	95,2	76,2	57,1	57,1
Персиковая	80,9	38,1	0	0	95,2	76,2	66,7	47,6
Венгерка Юбилейная	71,4	23,8	0	0	90,5	80,9	47,6	33,3

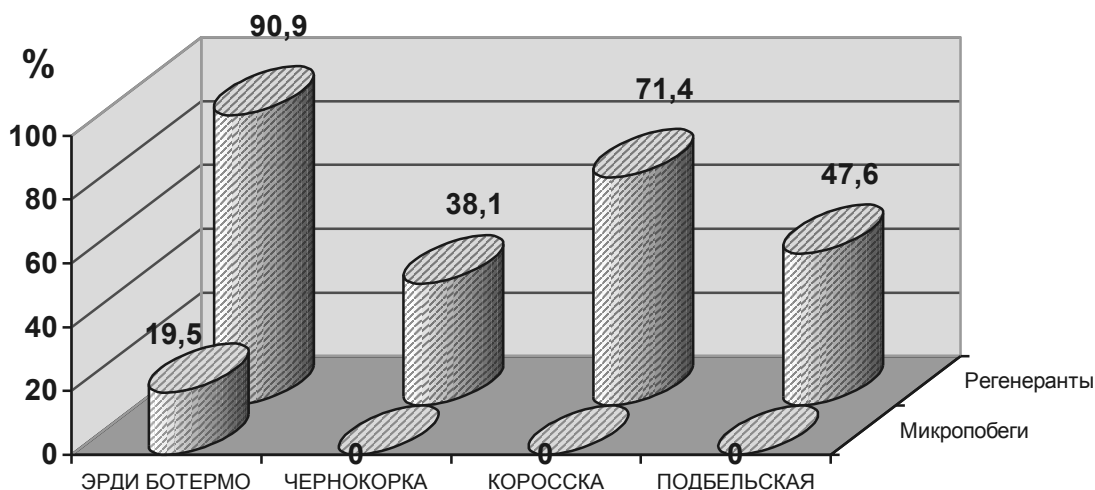


Рис. 1. Жизнеспособность (%) микропобегов и регенерантов сортов *P. cerasus* через 40 суток термотерапии

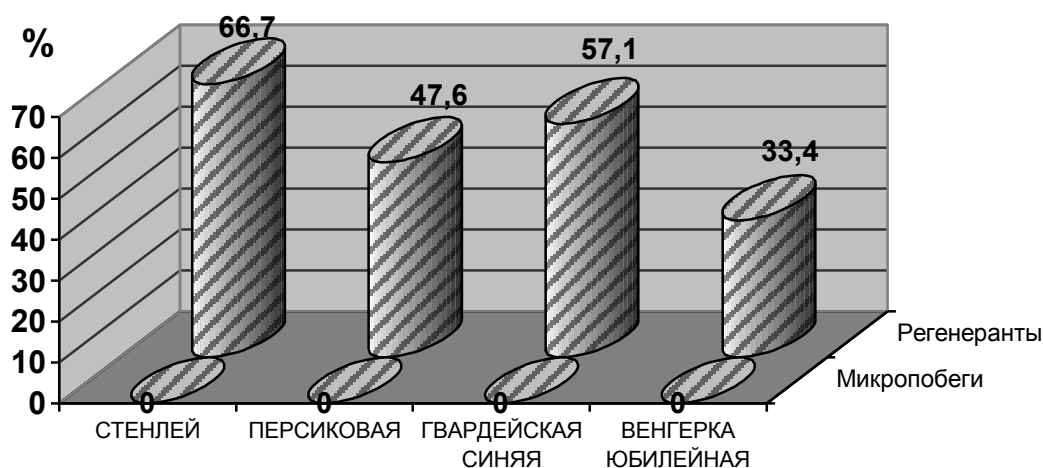


Рис. 2. Жизнеспособность (%) микропобегов и регенерантов сортов *P. domestica* через 40 суток термотерапии

Как известно, нормальный рост и развитие во время термотерапии являются важными показателями жизнеспособности растений [13, 17, 18]. Исследованиями показана возможность увеличения прироста растений во время термотерапии при введении в питательную среду МС-3 гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 5,77 мкМ. При этом прирост растений вишни увеличивался, в среднем, на $1,5 \pm 0,12$ см, что на 44,9% больше по сравнению с контролем.

В результате проведенной термотерапии *in vitro* получены безвирусные растения вишни сортов Подбельская, Чернокорка, Эрди Ботермо, Коросска и сливы сортов Стенлей, Гвардейская Синяя, Персиковая, Венгерка Юбилейная. Преимущество термотерапии в условиях *in vitro* по сравнению с традиционной термотерапией достаточно велико. Сроки получения оздоровленных растений сокращаются с 1-2 лет до 4-5 месяцев. При этом состав питательной среды и воздействие биологически активных веществ играют существенную роль в повышении жизнеспособности растений вишни и сливы в условиях экстремальных температур. Все это следует учитывать при оздоровлении косточковых плодовых культур от вирусных инфекций.

Спустя 4 месяца после адаптации проводили ретестирование оздоровленных растений. Как показали наши исследования, другим не менее эффективным биотехнологическим приемом оздоровления растений от вирусных инфекций является сочетание методов хемотерапии *in vitro* и культуры органов и тканей растений. Испытание вироцидов

проводили на 2 сортах вишни (Подбельская, Чернокорка) и 2 сортах сливы (Персиковая, Стенлей), пораженных вирусами PNRSV и PDV, кроме того, сорт сливы Стенлей был инфицирован вирусом шарки (PPV). Экспланты (вегетативные почки), отобранные с зараженных деревьев в период выхода их из состояния покоя, культивировали на среде МС-2. Результаты опытов по эффективности применения вирицидов: виразола (рибавирина) и НЕО-DНТ представлены в таблице 3, из которой видно, что оба вирицида оказались эффективными против вирусов некротической кольцевой пятнистости (PNRSV), карликовости (PDV) и шарки сливы (PPV).

Таблица 3

Результаты хемотерапии *in vitro* вишни сорта Подбельская и сливы сортов Персиковая и Стенлей

Вирицид, концентрация	Количество безвирусных растений / общее количество тестируемых растений (%)				
	Подбельская		Персиковая		Стенлей
	PNRSV	PDV	PNRSV	PDV	PPV
Контроль	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
Виразол:					
1 мг/л	0/19 (0)	0/19 (0)	0/18 (0)	0/18 (0)	0/21 (0)
5 мг/л	0/20 (0)	0/20 (0)	1/17 (5,8)	2/17 (11,8)	1/20 (5,0)
10 мг/л	3/19 (15,8)	1/19 (5,3)	4/17 (23,5)	3/17 (17,6)	6/20 (30,0)
20 мг/л	17/18 (94,4)	15/18 (83,9)	9/11 (81,8)	7/11 (63,6)	16/21 (78,2)
50 мг/л	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
НЕО-DНТ:					
50 мг/л	11/18 (61,1)	12/18 (66,7)	14/19 (73,6)	15/19 (78,9)	1/20 (5,0)
85 мг/л	10/16 (62,5)	10/18 (55,6)	13/16 (81,3)	12/16 (75,0)	16/20 (80,0)
100 мг/л	11/17 (64,1)	12/16 (75,0)	10/12 (83,3)	11/12 (91,6)	-

С повышением концентрации вирицидов (виразола выше 20 мг/л и НЕО-DНТ выше 100 мг/л) обнаружено их высокое фитотоксическое действие. Это проявлялось в значительном угнетении роста и развития и отмирании апикальной части микропобегов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Персиковая и Стенлей (рис. 3, 4).

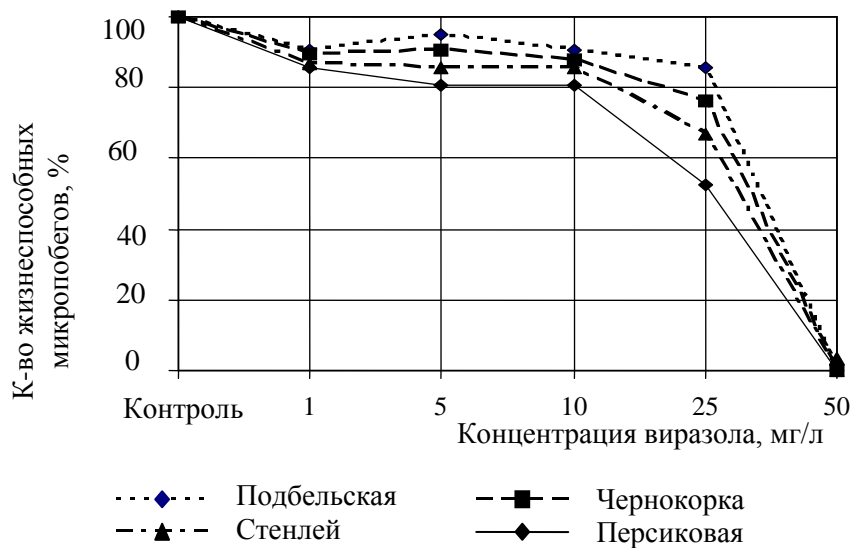


Рис. 3. Жизнеспособность микропобегов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Стенлей и Персиковая при введении в питательные среды виразола

После трех недель культивирования *in vitro* с ингибиторами вирусов микропобеги пассировали на питательную среду МС-3, на которой происходило укоренение. Затем, спустя 4 месяца после их адаптации в условиях *in vivo*, растения вишни и сливы ретестировали на отсутствие вирусов с использованием метода ELISA, который подтвердил элиминацию PDV, PNRSV и PPV в опытах с виразолом в концентрации 20 мг/л и оздоровление от PDV и PNRSV в опытах с НЕО-DHT в концентрации 100 мг/л, а от вируса шарки (PPV) эффективной была концентрация НЕО-DHT 85 мг/л (табл. 3).

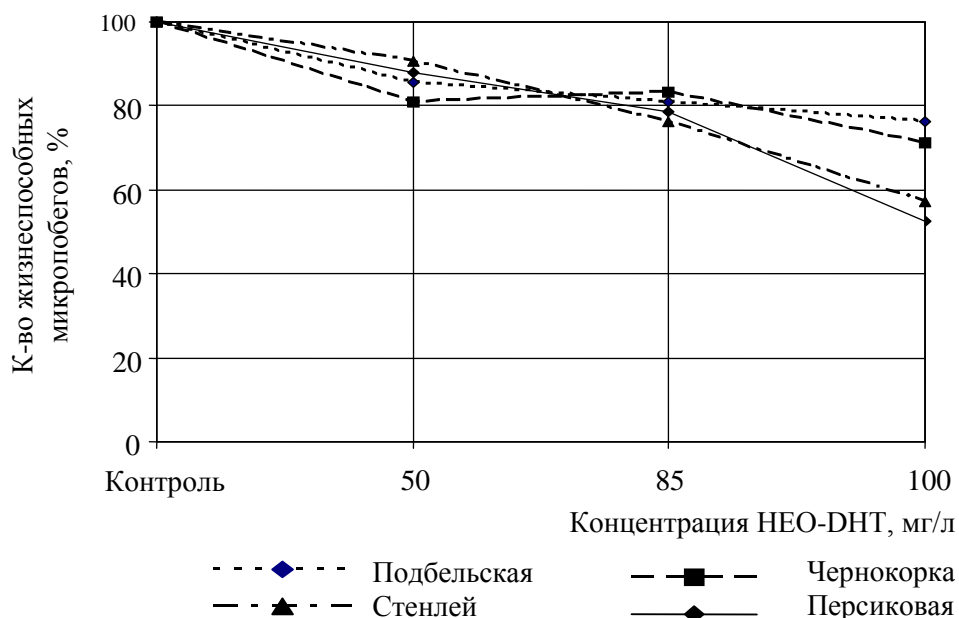


Рис. 4. Жизнеспособность микропобегов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Стенлей и Персиковая при введении в питательные среды НЕО-DHT

Проведенные эксперименты показали эффективность совместного применения ингибиторов вирусов и культивирования *in vitro* вишни и сливы, что согласуется с ранее полученными нами и другими авторами данными [11, 12, 14, 19].

Таким образом, разработанные биотехнологические приемы оздоровления 8 сортов вишни и сливы, при сочетании методов термотерапии *in vitro* с культурой органов и тканей и хемотерапии *in vitro* с культурой органов и тканей, показали высокую эффективность получения исходного материала, свободного от вредоносных сокопереносимых вирусов *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) и *Plum pox potyvirus* (PPV).

Список литературы

1. Бондаренко П.Е. Вирусные болезни яблони, черешни и вишни в лесостепи Украинской ССР и отбор безвирусных клонов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Киев, 1985. – 19 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. – М.: Наука, 1985. – 184 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
5. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Вердеревская Т.Д. Плодовые культуры // Борьба с вирусными заболеваниями растений: Пер. с нем. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 326-356.
6. Лукичева Л.А. Использование ингибиторов вирусов для оздоровления сливы в условиях *in vitro* // Пути решения проблем и перспективы развития биотехнологии в декоративном садоводстве и плодоводстве: Тезисы докл. Междунар. конф., Ялта, 25-26 сентября 1997. – Ялта, 1997. – С. 36.

7. Лукичева Л.А. Особенности клонального микроразмножения безвирусных сортов вишни и сливы // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 34-45.
8. Лукичева Л.А., Митрофанов В.И. Оздоровление вишни и сливы методом термотерапии *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада – 2002. – Вып. 86. – С. 59 -61.
9. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
11. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта. – 2000. – 46 с.
12. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111-120.
13. Помазков Ю.И., Литвиненко И.С. Вирусные болезни плодовых культур и меры борьбы с ними // Сельскохозяйственная биология. – 1974. – Т. 9, № 5. – С. 643-647.
14. Тесленко А.В., Митрофанова О.В., Лукичева Л.А. Разработка технологий получения безвирусного посадочного материала персика // Труды Никит. ботан. сада. – 1986. – Т. 99. – С. 85-92.
15. Цуркан И.Г. Термическая терапия плодовых, ягодных культур и винограда, пораженных вирусами // Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев: Картя молдавеняскэ, 1973. – С. 68-125.
16. Цуркан И.Г., Бивол Т.Ф. Термотерапия латентных вирусов яблони и её эффективность // Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых, ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев, 1983. – С. 64-72.
17. Cieslinska M., Zawadzka B. Preliminary results of investigation on elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy *in vitro* // Phytopathol. Pol. – 1999. – Vol. 17. – P. 41-48.
18. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. – 1977. – Vol. 34, N 3. – P.475-483.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3 – P. 473 – 497.
20. Nemeth M. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. – Budapest: Akademiai Kiado, 1986. – 841 p.
21. Richter J. Serology // Klinkowski M. Pflanzliche virologie. – Berlin: Akademie-Verlag, 1980. – Bd. 1. – S.354-382.

**Biotechnological methods of cleaning up cultivars of cherry (*Prunus cerasus* L.)
and plum (*Prunus domestica* L.)**

Lukichyeva L.A., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P.

The biotechnological methods of cherry and plum plants cleaning up from viruses (PDV, PNRSV, PPV) on the basis of complex application of thermo-, chemotherapy *in vitro* methods and tissue and organ culture have been recommended.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ХЕНОМЕЛЕСА (*CHAENOMELES LINDL.*) В СВЯЗИ С ПЕРСПЕКТИВАМИ ЕГО ПРОМЫШЛЕННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ

В.Н. ЕЖОВ, доктор технических наук, профессор, академик УААН;

А.К. ПОЛОНСКАЯ, кандидат биологических наук;

Л.Д. КОМАР-ТЕМНАЯ, кандидат биологических наук;

И.В. ВОЛОШИНА, Б.А. ВИНОГРАДОВ

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

В последние десятилетия одним из актуальных направлений садоводства является расширение сортимента плодовых растений культурами с высоким содержанием биологически активных веществ (БАВ). К подобного рода растениям относится хеномелес. Восемь сортов хеномелеса селекции Национального ботанического сада (г. Киев) и Артемовского научно-исследовательского центра Института садоводства (г. Артемовск) уже введено в Реестр сортов растений Украины. В Никитском ботаническом саду - Национальном научном центре (НБС-ННЦ) ведутся работы по изучению возможности введения его в культуру промышленного и приусадебного садоводства Крыма, а также поиску оптимальных вариантов хозяйственного использования плодов и других частей растения.

Плоды хеномелеса являются ценным сырьем для пищевой, фармацевтической и парфюмерной промышленности благодаря богатому химическому составу. В них найдены биологически активные вещества (аскорбиновая кислота, каротин, витамины группы В), органические (яблочная, лимонная, винная, фумаровая, хлорогеновая, хинная) и ароматические (кофейная, изомеры кумаровой) кислоты, пектиновые, фенольные, минеральные вещества, углеводы, жирные масла [21]. Высокое содержание органических кислот, пектинов, витамина С, Р-активных соединений, эфирных масел выгодно отличает плоды хеномелеса от других плодовых культур. Они в 5-10 раз превышают цитрусовые по количеству аскорбиновой кислоты и занимают одно из первых мест среди плодово-ягодных растений по содержанию пектина и рутина [20]. Сравнение с цитрусовыми культурами уместно еще и потому, что вкус плодов хеномелеса частично напоминает цитрусовые, частично - яблоки и айву [16, 17].

Аскорбиновой кислоты, или витамина С, содержится в плодах хеномелеса в среднем около 150 мг/100 г, с амплитудой от 20 до 300 и более мг/100 г. Рост содержания аскорбиновой кислоты продолжается и после съема плодов, при хранении оно длительное время остается на высоком уровне [24].

Из других витаминов в плодах обнаружены каротин (провитамин А), в мякоти от 0,1 до 2,0 мг/100 г, в кожице некоторых форм - до 20 мг/100 г, а также витамины группы В. Вяжущий вкус плодов обусловлен полимерными формами фенольных соединений, содержание которых по мере созревания уменьшается [18].

Плоды хеномелеса и продукты их переработки обладают уникальным, приятным и стойким ароматом, обусловленным наличием энантово-этилового и пеларгоново-этилового эфиров [21]. По другим данным, ароматобразующие вещества имеют более разнообразную природу и представлены спиртами, кетонами, терпенами, альдегидами и эфирами [18].

Семена хеномелеса содержат 10-23% жирного масла, в нем много ненасыщенных жирных кислот, главным образом, линолевой (44-58%), и олеиновой (27-44%) [18].

Высокое содержание органических кислот в соке, отчетливый аромат и большое количество остатков клетчатки делает плоды хеномелеса ценным сырьем в промышленной переработке [14-16]. Кроме того, плоды хеномелеса нечувствительны к окислению в течение обработки, т.к. сок отличается высоким уровнем содержания аскорбиновой кислоты и фенольных компонентов, действующих как антиоксиданты [17]. Наиболее полная схема переработки плодов хеномелеса была разработана польскими исследователями Е. Lesinska и D. Kraus [17]. Из них можно готовить сок, арома-экстраты, компоты, варенье, джем, сироп, желе, пюре, мармелад, цукаты, конфеты, алкогольные (ликер, наливка, пунш, настойка) и

безалкогольные (типа лимонада) напитки, использовать в качестве компонента комплексных плодово-овощных консервов, при купажировании соков и напитков, для улучшения вкуса конечного продукта. Из выжимок можно вырабатывать фруктовый порошок, клетчатку и пектин. Некоторые из этих продуктов (сироп, ликер, слабо газированные напитки, повидло и конфеты) можно найти на латвийском и литовском рынках [25].

В предыдущие годы в НБС-ННЦ было проведено изучение ряда химических компонентов и лечебных свойств плодов хеномелеса, изготовлены экспериментальные продукты переработки, подтверждающие ценность этой культуры.

Анализ химического состава плодов хеномелеса, произрастающего в НБС-ННЦ, показал существенное разнообразие семян по накоплению сухих веществ (10,4-26,3%), углеводов (0,78-5,84%), аскорбиновой кислоты (77,8-370 мг/100 г), титруемых кислот (2,8-9,7%), лейкоантоцианов (464-1872 мг/100 г), что указывает на перспективность отбора по содержанию этих веществ [12, 13].

Сведения о ценности плодов хеномелеса были дополнены при определении их элементного состава. В них выявлены важнейшие (*Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Cr, Mo*) и условно важные (*V, Ni, As*) для организма человека элементы. При этом установлено, что по количеству *Ca* и *Fe* (около 15 и 0,5 г/кг сухого вещества) плоды хеномелеса превосходят яблоки, груши, вишни, абрикос, землянику и могут служить источниками этих элементов [11].

При дегустации экспериментальных продуктов переработки из плодов хеномелеса (варенье, джем, газированный напиток) были получены высокие оценки.

Изучение лечебных свойств плодов хеномелеса, проведенное совместно с медико-реабилитационным центром “Жемчужина” (г. Ялта), выявило перспективность их использования, в частности, в форме гомеопатических препаратов, которые оказывали ярко выраженное иммуностимулирующее действие, снижали восприимчивость организма человека к инфекциям, способствовали излечению от аллергических реакций, нормализовывали обмен веществ, работу селезенки, поджелудочной железы, улучшали микроциркуляторный кровоток [10].

Все эти сведения о перспективности культуры хеномелеса послужили основанием для ее дальнейшего изучения в условиях Южного берега Крыма, способного выполнять функцию круглогодичного курорта и обеспечивать оздоровление людей высоковитаминным, диетическим питанием.

Целью настоящей работы явилось более детальное определение отдельных химических компонентов, содержащихся в плодах и в их кожице, листьях, семенах, а также оценка помологических и химических свойств перспективных селекционных форм хеномелеса.

Материалы и методы

Работа проводилась на сеянцах *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. и *C. spesiosa* Nakai селекционного фонда Никитского ботанического сада, произрастающих в условиях Южного берега Крыма. Помологическая оценка была дана в соответствии с методикой сортоизучения этой культуры [23]. Отбор средних проб плодов, подготовка к анализу и определение их химического состава проводили общепринятыми в биохимии растений методами [9, 27] и в соответствии с существующей нормативно-технической документацией [1-4, 7]. Компонентный состав эфирного масла кожицы и мякоти плодов определяли методом газожидкостной хроматографии. Элементарный состав определяли методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии. Антиокислительные свойства растительных экстрактов изучали ускоренно-кинетическим методом на модели термического автоокисления олеиновой кислоты - по ингибированию ими процесса перекисного окисления [18]. Жирное масло из воздушно-сухих измельченных семян извлекали путем экстрагирования петролейным эфиром в аппарате Сокслета при температуре кипения 45-50°C [19]. Состав жирных кислот определяли с помощью газожидкостной хроматографии этиловых эфиров этих кислот, полученных после гидролиза масла и последующей этерификации. Подготовку образцов, в частности, превращение триглицеридов жирных кислот в этиловые эфиры проводили по методике [5],

модифицированной нами, согласно которой пробу (0,05 мл) масла семян растворяли при кипении в 1 мл раствора этилата натрия в 96 %-ном этаноле (0,02 моль/л, 0,1%), после растворения в смесь добавляли 0,05 мл конц. HCl, 1 мл этилового спирта и упаривали до 0,1 мл (до появления капель этиловых эфиров жирных кислот); после отстаивания и агрегации капель хроматографическим шприцом отбирали для анализа 0,2-0,4 мкл из верхнего слоя. Капиллярную хроматографию масла проводили на хроматографе, снабженном пламенно-ионизационным детектором, кварцевой капиллярной колонкой 30 м с внутренним диаметром 0,33 мм (неподвижная фаза - FFAP; газ-носитель - водород, расход 3 мл/мин; программирование температуры: Tнач. колонки 180°C, скорость нагрева 4 град./мин; Tкон. колонки 220°C; расход воздуха в детекторе 250 мл/мин, расход водорода 32 мл/мин, T детектора 250°C, T испарителя 250°C. Расчеты концентраций выполняли методом внутренней нормализации, принимая поправочные коэффициенты для всех компонентов смеси за единицу [6], с помощью системы автоматизации анализов САА-006.

Для исследования состава жирных масел проводили разложение масла на отдельные составляющие (жирные кислоты) и метилирование выделившихся кислот методом переэтерификации 14%-ным раствором BCl_3 в безводном метаноле (K. Blau & J. Halket. Handbook of Derivatives for Chromatography (2nd ed.) John Wiley & Sons, NY, 1993). Для этого в виалу на 2 мл наливали 1 мл метилирующего реактива (Supelco, #3-3033) и добавляли 1-2 мг жирного масла. Нагревали реакционную смесь в виале, плотно закрытой тефлоновой крышкой, при 85-90°C в течение двух часов. После того как капля растворялась (смотрели в лупу, чтобы убедиться, что в реакционной смеси нет эмульсионных включений), виалу охлаждали и реакционную смесь нейтрализовали 0,3-0,5 мл 5 %-ным раствором NaOH, контролируя нейтрализацию по универсальной индикаторной бумажке. Раствор при нейтрализации становится молочно-мутным. После нейтрализации в него добавляли 0,2-0,3 мл хлороформа и слегка встряхивали. При этом метиловые эфиры жирных кислот переходили в раствор хлороформа. Раствор метиловых эфиров жирных кислот в хлороформе отбирали микрошприцом из нижнего слоя и хроматографировали. Идентификацию компонентов проводили методом хромато-масс-спектрометрии (хроматограф Agilent Technologies 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973 и базой данных NIST02). Условия хроматографического анализа: колонка кварцевая HP-5 (Agilent Technologies, США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм; газ-носитель – гелий; расход газа-носителя – 1мл/мин; температура самплера 270°C; температуру термостата программировали от 100 до 230°C (5 град/мин); объем образца – 0,2-2 мкл.

Результаты и обсуждение

Полученные данные помологической оценки и химического состава плодов хеномелеса свидетельствуют о большом фенотипическом разнообразии изученных образцов. Это согласуется с предыдущими результатами, полученными в условиях ЮБК [12, 13], а также с исследованиями, проведенными в Молдове, Латвии и Швеции [22, 26], и, вероятно, является характерной особенностью рода.

Особого внимания для селекции заслуживают формы хеномелеса с низким уровнем кислотности, лейкоантоцианов и высоким содержанием аскорбиновой кислоты и пектинов.

Многие изученные образцы хеномелеса отличаются высоким (по стандартам методики сортооценки - 151-200 мг/100 г) и очень высоким (стандарт - более 200 мг/100 г) уровнем содержания аскорбиновой кислоты. Это опровергает существующее мнение [21] о снижении накопления этого вещества при культивировании хеномелеса в более южных районах по сравнению с более северными. Вероятно, в данном случае имеет значение высокая вариабельность хеномелеса как по этому, так и по другим признакам.

Низкая кислотность для хеномелеса лежит в пределах 2,1-3,5%, очень низкая – меньше 2,1%, что встречается не так часто. Тем не менее, в опыте найдены 2 формы с очень низкими значениями этого показателя – 1,44% и 1,91%. Примечателен также тот факт, что одна из этих форм, П 5/14, характеризуется высоким показателем суммы углеводов и сравнительно низким

уровнем накопления лейкоантоцианов, что делает ее плоды ценным сырьем для консервного производства.

Комплексная оценка помологических и химических признаков показала, что среди изученных образцов хеномелеса имеются формы с достаточно крупными для засушливых условий Крыма плодами (массой от 40 до 70 г) и урожайностью в 3-4 балла, характеризующиеся при этом высоким или очень высоким уровнем накопления аскорбиновой кислоты, а также низким и даже очень низким уровнем титруемой кислотности и лейкоантоцианов. Наиболее перспективными из них являются П 1/10, П 1/11, П 5/11, П 5/14, Пх 1/7, Пх 1/21. Для сравнения отметим, что районированный сорт Николай (контроль) характеризуется плодами массой 50-80 г, средним уровнем накопления аскорбиновой кислоты и средним уровнем титруемой кислотности и лейкоантоцианов (табл. 1).

Остановимся подробнее на содержании некоторых химических веществ в плодах хеномелеса. Сравнительное изучение урожая трех лет показало существенную вариабельность в накоплении тех или иных веществ как в пределах группы изучаемых сортообразцов, так и в пределах одного сортообразца по годам. Усредненные результаты анализа плодов хеномелеса 25-ти сортообразцов, представленные в таблице 2, свидетельствуют об очень высоком накоплении аскорбиновой кислоты в плодах сортообразца хеномелеса П 1/11 – 355.5 мг/100 г. Выдающимся по содержанию лейкоантоцианов был образец П 4/14 (800 мг/100 г). Низкую титруемую кислотность (2,2% и ниже) показали образцы П 5/5, П 1/11 и П 1/14, все остальные образцы имели титруемую кислотность выше этого уровня и достигали 5,5% (П 3/17). Плоды хеномелеса в условиях Южного берега Крыма накапливают сравнительно небольшое количество сахаров: 3,5% общих сахаров имели образцы П 5/9, П 1/11, П 5/11 и только образец П 5/14 имел более высокий уровень накопления сахаров – 4,8%.

Таблица 1

**Краткая характеристика перспективных сортообразцов хеномелеса
(*Chaenomeles* Lind.) (2003-2005 гг.)**

Форма	Средняя масса плода, г	Урожайность, балл	Максимальный уровень содержания аскорбиновой кислоты	Максимальный уровень кислотности	Максимальный уровень содержания лейкоантоцианов
П 1/10	46	3	очень высокий	средний	очень низкий
П 1/11	40	4	очень высокий	очень низкий	низкий
П 26/5	40	2	высокий	средний	средний
П 3/17	51	3	очень высокий	высокий	низкий
П 4/14	42	3	очень высокий	средний	низкий
П 5/9	47	4	средний	средний	высокий
П 5/5	41	4	средний	средний	средний
П 5/11	69	3	высокий	низкий	низкий
П 5/14	55	2	высокий	очень низкий	низкий
Пх 0/9	45	2	высокий	средний	средний
Пх 0/12	44	3	высокий	средний	средний
Пх 1/4	25	4	очень высокий	средний	низкий
Пх 1/7	42	3	высокий	низкий	низкий
Пх 1/13	43	2	высокий	средний	средний
Пх 1/21	50	4	очень высокий	средний	низкий
Николай (контроль)	50-80	3	средний	средний	средний

Таблица 2

Химический состав плодов хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Образец	Сухие вещества, %	Аскорбиновая кислота, мг/100 г	Титруемые кислоты, %	Лейкоантоцианы, мг/100 г
П 1/5	11,0	102,3	4,9	403
П 1/10	11,3	240,8	5,0	331
П 1/11	11,20	355,5	1,9	440
П 2б/5	11,5	153,0	5,0	605
П 3сб./1	8,8	38,7	-	432
П 3/17	12,5	283,5	5,8	410
П 4/10	12,0	58,7	-	544
П 4/12	12,5	148,7	-	408
П 4/14	10,7	208,3	5,0	547
П 5/5	8,45	117,2	2,2	544
П 5/9	12,50	136,9	3,8	800
П 5/11	11,05	199,9	3,4	464
П 5/14	10,88	149,3	1,4	528
Пх 0/5	11,7	135,3	3,8	547
Пх 0/9	13,7	164,4	3,7	518
Пх 0/12	13,3	184,4	5,0	518
Пх 0/22	13,0	138,8	5,2	562
Пх 1/4	11,3	211,6	4,8	403
Пх 1/7	9,4	144,8	2,8	504
Пх 1/9	9,7	68,8	3,6	504
Пх 1/13	12,8	150,2	3,8	662
Пх 1/21	13,4	231,2	4,1	418
Пх 1/23	18,9	125,8	4,6	504
Пх 3/4	11,7	129,3	4,4	418

У 11 сортообразцов из 25 содержание аскорбиновой кислоты превышало 150 мг/100 г. Количество лейкоантоцианов колебалось в диапазоне от 331 мг/100 г (П 1/10) до 800 мг/100 г (П 5/9).

На рис. 1-4 графически представлены сравнительные характеристики сортообразцов по среднему содержанию основных химических показателей плодов за три года урожая (2003-2005 гг.).

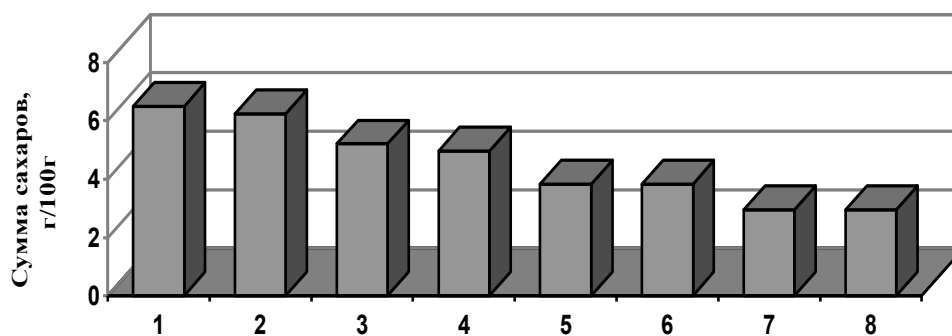


Рис. 1. Содержание суммы сахаров в плодах хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*) 1 – П 1/11; 2 – П 3/4; 3 – П 1/10; 4 – П 4/12; 5 – П 5/9; 6 – П 4/10; 7 – П 5/5; 8 – П 3/6

На рисунке 1 наглядно показано умеренное накопление углеводов в плодах хеномелеса от 2,0 до 5,8%, максимальным содержанием углеводов характеризуются плоды сортообразцов П 1/11 и П 3/4.

Рисунок 2 иллюстрирует содержание одного из основных показателей питательной ценности плодов – аскорбиновой кислоты. Образцы П 4/12 и П 1/11 характеризуются максимальным ее накоплением (130-150 мг/100 г), образцы П 5/9, П 3/4 и П 4/10 – средним (55-75 мг/100 г).

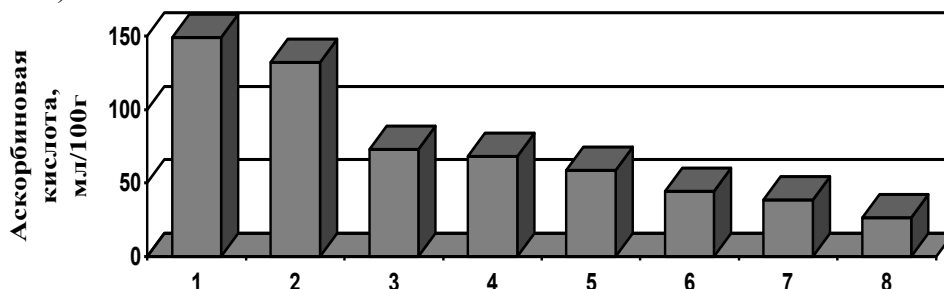


Рис. 2. Содержание аскорбиновой кислоты в плодах хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.) 1 – П 4/12; 2 – П 1/11; 3 – П 5/9; 4 – П 3/4; 5 – П 4/10; 6 – П 1/10; 7 – П 3/6; 8 – П 5/5

Фенольные вещества интересовали нас в связи с их известной ролью в формировании антиоксидантных свойств растения. Образец П 4/10 имеет максимум общего содержания фенольных веществ (780 мг/100 г), образцы П 1/11 и П 3/6 также характеризовались высоким уровнем их накопления (460-610 мг/100 г) (рис. 3).

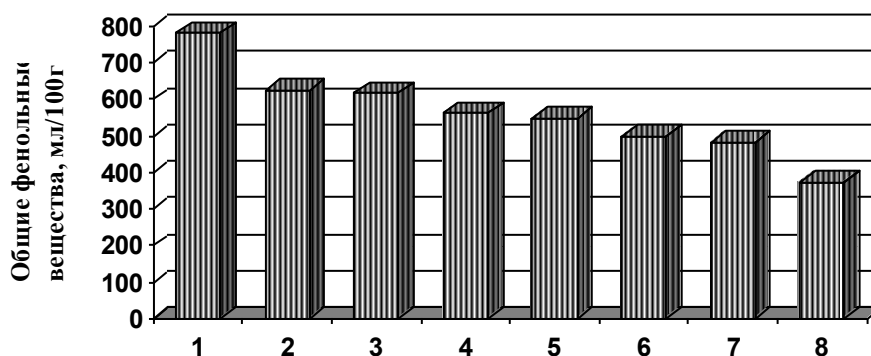


Рис. 3. Содержание общих фенольных веществ в плодах хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.) 1 – П 4/10; 2 – П 1/11; 3 – П 3/6; 4 – П 4/12; 5 – П 3/4; 6 – П 5/9; 7 – П 1/10; 8 – П 5/5

На рисунке 4 представлены данные о содержании в исследуемых образцах флавонолов и катехинов. Максимальным содержанием катехинов характеризуются плоды образцов П 3/4 и П 5/5, форма П 1/10 при высоком уровне катехинов содержит и повышенное количество флавонолов.

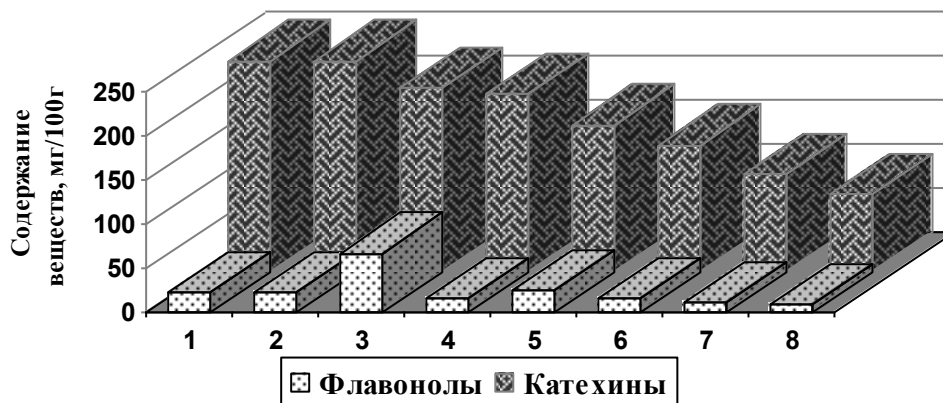


Рис. 4. Содержание флавонолов и катехинов в плодах хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.) 1 – П 3/4; 2 – П 5/5; 3 – П 1/10; 4 – П 4/10; 5 – П 3/6; 6 – П 4/12; 7 – П 5/9; 8 – П 1/11

Поскольку в последнее время большое значение придается изучению листьев плодовых культур как источнику биологически активных веществ, была поставлена задача - выявить биохимический потенциал листьев хеномелеса. В таблице 3 показано наличие в листьях тех же веществ, что и в плодах. Содержание аскорбиновой кислоты (14,3 мг/100 г), общее содержание фенольных веществ (1014 мг/100 г) в смеси листьев сортообразцов хеномелеса, свидетельствует об их значительном потенциале, высокой витаминной и антиоксидантной активности.

Таблица 3

Содержание химических веществ в листьях хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Наименование образца	Сухие вещества, %	Сахара		Аскорбиновая кислота, мг/100г	Титруемые кислоты, %	Фенольные вещества, мг/100г
		моно, г/100г	сумма, г/100г			
листья хеномелеса	89,7	3,1	6,0	14,3	0,46	1014

При пересчете на сухой вес содержание фенольных веществ в листьях почти в 3 раза превышает уровень их содержания в плодах (рис. 5), что позволяет ожидать более высокие антиоксидантные свойства у этих образцов. Последующее изучение антиоксидантной активности листьев показало превышение ее значения в четырежды разбавленном экстракте по сравнению с контролем – синтетическим антиоксидантом ионолом.

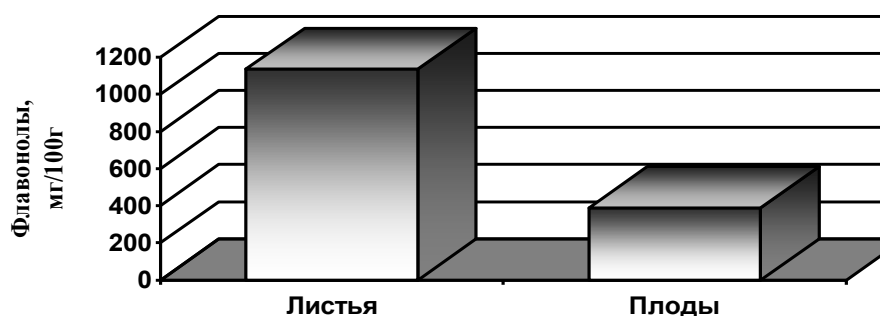


Рис. 5. Содержание флавонолов в листьях и плодах хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*) в пересчёте на сухой вес

Таким образом, выявлен широкий спектр питательных и биологически активных веществ в плодах и листьях хеномелеса.

Как логическое продолжение работы, исследовали возможности практического применения результатов исследования. В частности, одним из вариантов переработки плодов хеномелеса было приготовление соков. Свежеприготовленный сок обладал высоким содержанием аскорбиновой кислоты (670 мг/дм³), которое в процессе пастеризации уменьшилось почти в 5 раз, что для аскорбиновой кислоты характерно. Содержание фенольных веществ уменьшилось несущественно (табл. 4). Натуральные соки без добавления сахара характеризовались высокой кислотностью и недостаточной сахаристостью, однако обладали неповторимым ароматом.

Таблица 4

Содержание химических веществ в соках из плодов хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Наименование продукции	Сухие вещества, %	Аскорбиновая кислота, мг/дм ³	Фенольные вещества, мг/дм ³
сок из плодов хеномелеса до термической обработки	5,6	670,7	1690
сок из плодов хеномелеса после термической обработки	4,8	114,4	1508

Идентификацию компонентов аромата плодов хеномелеса проводили методом хромато-масс-спектрометрии (рис. 6). В составе гидродистиллята из плодов хеномелеса идентифицировано свыше 80 химических соединений, которые относятся к различным группам (табл. 5-14).

В первую очередь запах плодов определяется сложными эфирами (идентифицировано 19 компонентов), общее содержание которых составляет 11,93% общего дистиллята (табл. 5).

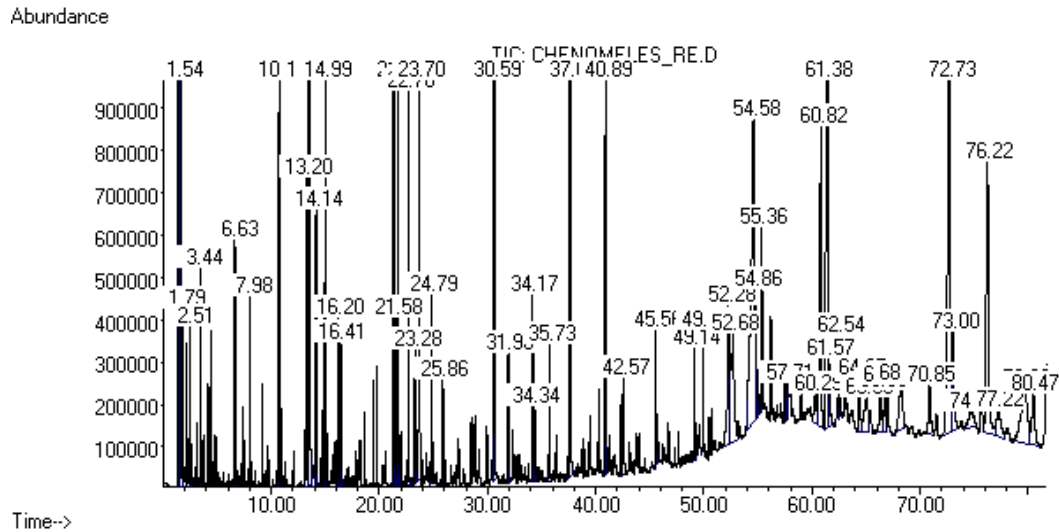


Рис. 6. Хроматограмма гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.).

Таблица 5

Состав сложных эфиров гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.).

Сложные эфиры	% к сумме компонентов аромата
этилацетат	0,36
бутилацетат	0,26
этилкапронат	0,51
цис-3-гексен-1-ол, ацетат	3,67
гексилацетат	0,28
бутилкапронат	0,79
этилкаприлат	1,78
цис-3-гексенилбутират	0,21
гексилкапронат	0,68
бутилкаприлат	1,66
октилизобутират	0,11
этиловый эфир цис-4-октеновой кислоты	0,13
3-гексенилкапронат	0,47
гексилкаприлат	0,28
3-гексенилкаприлат	0,21
нонилкаприлат	0,19
октилкаприлат	0,09
этилпальмитат	0,11
фенилметилкаприлат	0,14
сумма	11,93

Другой большой и важный в ароматическом отношении класс – это насыщенные и ненасыщенные жирные альдегиды (общее содержание 9,83%). Идентифицировано 15 компонентов (табл.6).

Таблица 6

Состав насыщенных и ненасыщенных жирных альдегидов гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*).

Насыщенные и ненасыщенные жирные альдегиды	% к сумме компонентов аромата
фурфурол	0,67
гексаналь	0,39
транс-2-гексеналь	0,12
гептаналь	0,68
транс-2-гептеналь	0,23
2-ноненаль	0,25
октаналь	0,12
транс-2-октеналь	0,24
нонаналь	4,30
2-деценаль	1,52
2,4-декадиеналь(Е,Е)	0,16
гексадеканаль	0,48
цис-9-гексадеценаль	0,51
13-октадеценаль	0,16
сумма	9,83

Следующим важным классом ароматических веществ в составе хеномелеса можно назвать нортерпеноиды (табл. 7) - вещества терпеновой природы, строение которых отличается от настоящих терпеновых структур. Нами идентифицировано 5 компонентов, количество их мало (1,24%), но так как они обладают сильными запахами, вклад этой группы значителен.

Таблица 7

Состав нортерпеноидов гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Нортерпеноиды	% к сумме компонентов аромата
α -ионол	0,55
α -ионон	0,27
β -ионон	0,11
цис-мегастигматриенон	0,12
транс-мегастигматриенон	0,19
сумма	1,24

Спирты, которые находятся в дистилляте в количестве 2,48% (идентифицировано 8 компонентов), практически влияют на аромат лишь за счет входящих в этот комплекс ненасыщенных соединений: Цис-3-гексен-1-ол имеет запах свежей зелени, 1-октен-3-ол обладает тонким запахом грибов, эти вещества в низких концентрациях придают тона свежести (табл. 8).

Несколько меньший вклад в аромат вносят содержащиеся в большом количестве в дистилляте хеномелеса жирные кислоты (36,95%). Идентифицировано 13 кислот (табл. 9). Часть этих кислот (от каприловой до лауриновой) обладают «жирными» запахами с фруктовым оттенком, кислоты же более высокого молекулярного веса не имеют запаха и фактически являются природными растворителями.

Таблица 8

**Состав спиртов гидродистиллята из плодов хеномелеса
(*Chaenomeles* Lind.)**

Спирты	% к сумме компонентов аромата
этанол	0,44
изобутанол	0,08
гексанол	0,10
цис-3-гексен-1-ол	0,98
1-октен-3-ол	0,09
октанол	0,39
цис-2-октен-1-ол	0,18
деканол	0,22
сумма	2,48

Таблица 9

Состав жирных кислот гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)

Жирные кислоты	% к сумме компонентов аромата
капроновая кислота	5,15
гептановая кислота	0,66
каприловая кислота	9,32
нонановая кислота	1,70
каприновая кислота	0,15
9-деценовая кислота	0,60
лауриновая кислота	0,45
миристиновая кислота	0,73
пентадекановая кислота	0,17
пальмитиновая кислота	6,27
стеариновая кислота	0,39
олеиновая кислота	7,66
линолевая кислота	3,70
сумма	36,95

Терпеновые соединения (идентифицировано 4 компонента) находятся в очень небольшом количестве (1,53%) и оказывают на запах дистиллята лишь небольшое влияние цветочного направления (табл.10).

Таблица 10

**Состав терпеновых соединений гидродистиллята из плодов
хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)**

Терпеновые соединения	% к сумме компонентов аромата
линалоол	0,37
линалоолоксид	0,17
α -терпинеол	0,64
эвдесмол	0,35
сумма	1,53

Группа фенольных веществ и их метиловых эфиров с общим содержанием 4,01% (табл. 11) также оказывают слабое влияние на аромат хеномелеса, эти вещества имеют запах напоминающий анис. Идентифицировано 5 компонентов.

Таблица 11

Состав метиловых эфиров фенольных веществ гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)

Фенольные вещества (метиловые эфиры)	% к сумме компонентов аромата
анетол	0,15
метилэвгенол	0,63
хавикол	0,15
метилхавикол	2,92
ацетилхавикол	0,16
сумма	4,01

Некоторое влияние на аромат хеномелеса могут оказывать содержащиеся в плодах производные нафталина, которые имеют смолистые запахи, хотя при таких малых концентрациях их влияние слабо (табл. 12).

Таблица 12

Состав производных нафталина гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)

Производные нафталина	% к сумме компонентов аромата
1,1,6-триметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин	0,13
1,1,6-триметил-1,2-дигидронафталин	0,09
1,6-диметил-4(1-метилэтил)-нафталин	0,45
сумма	0,67

Таблица 13

Состав углеводов и производных бензопирана гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)

Углеводы (5,17%) и производные бензопирана 0,63%	% к сумме компонентов аромата
октан	0,41
декан	0,14
1,3,5-триметилбензол	0,10
циклодецен	0,23
эйкозагексадецен-1	1,50
эйкозаноадекан (C ₂₉)	2,79
сумма	5,17

Таблица 14

Другие вещества гидродистиллята из плодов хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.)

Другие вещества	% к сумме компонентов аромата
цис-триметил-тетрагидро-бензопиран	0,50
тетраметил-гексагидро-бензопиран	0,13
сумма	0,63

Таким образом, аромат дистиллята из плодов хеномелеса в основном формируется за счет сложных эфиров (фруктовые запахи), жирных насыщенных и ненасыщенных

альдегидов (запахи цитрусовых с травянисто-зеленым тоном), ненасыщенных спиртов (травянисто-грибные, свежие и огуречные), жирных кислот (жирные, фруктовые) и нортерпеноидов (запахи экзотических цветов, фиалки). Остальные группы веществ (терпены, фенолы, бензопираны и нафталины) из-за их небольшого содержания и слабых запахов оказывают слабое влияние, но способны придавать аромату некоторое специфическое «звучание».

Кожицу плодов хеномелеса на компонентный состав летучих веществ, с точки зрения использования экстракта из нее для ароматизации плодовой консервной продукции и напитков, исследовали отдельно. В табл. 15 представлен многокомпонентный состав эфирного масла кожицы плодов хеномелеса (сортообразец П 5/9), формирующий в основном аромат плодов. Идентифицировано 22 компонента. Большую долю летучих веществ составляют метилэвгенол (8,89%), тетрагидро-1,1,6-триметилнафталин (6,92%), метилхавикол (4,62%), этилбутират (3,23%), транс-2-гексеналь (2,64%), 1,2,3,4,-тетрагидро-1,1,6-триметилнафталин (2,41%), на долю остальных компонентов приходится менее 2%, однако именно совокупность этих компонентов формирует оригинальный специфический аромат плодов.

Таблица 15

**Компонентный состав эфирного масла кожицы плодов
хеномелеса (*Chaenomeles* Lind.) П 5/9**

№ пп	Летучий компонент эфирного масла	% к сумме летучих компонентов
1	цис-2-гексеналь	1,27
2	этилбутират	3,23
3	фурфурол	1,12
4	транс-2-гексеналь	2,64
5	3-гексен-1-ол	1,03
6	гептаналь	0,77
7	этиловый эфир 3-оксимасляной кислоты	0,30
8	этилкапронат	0,67
9	октаналь	0,34
10	2-октеналь	0,24
11	октанол	0,89
12	нонаналь	9,00
13	этил-3-ацетоксибутират	0,27
14	2-ноненаль	0,29
15	этилбензоат	0,64
16	метилхавикол	4,62
17	1,2,3,4,-тетрагидро-1,1,6-триметилнафталин	2,41
18	2-деценаль	1,67
19	тетрагидро-1,1,6-триметилнафталин	6,92
20	1,2-дигидро-1,1,6-триметилнафталин	1,46
21	этил-4-деценоат	0,76
22	метилэвгенол	8,89
неидентифицированные летучие компоненты		50,57
сумма летучих компонентов		100

Выход масла из семян хеномелеса составил 17,78%. В табл. 16 приведены его физико-химические показатели, из которых следует, что масло из семян хеномелеса относится к полувывсыхающим маслам, к которым также относятся оливковое, миндальное, абрикосовое, хлопковое масла.

Таблица 16

**Физико-химические свойства масла семян
хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)**

Выход масла, %	Показатель преломления	Удельный вес	Кислотное число	Число омыления	Йодное число
17,78	1,4731	0,916	0,232	127	115,25

Впервые был исследован состав жирного масла семян хеномелеса (рис. 7).

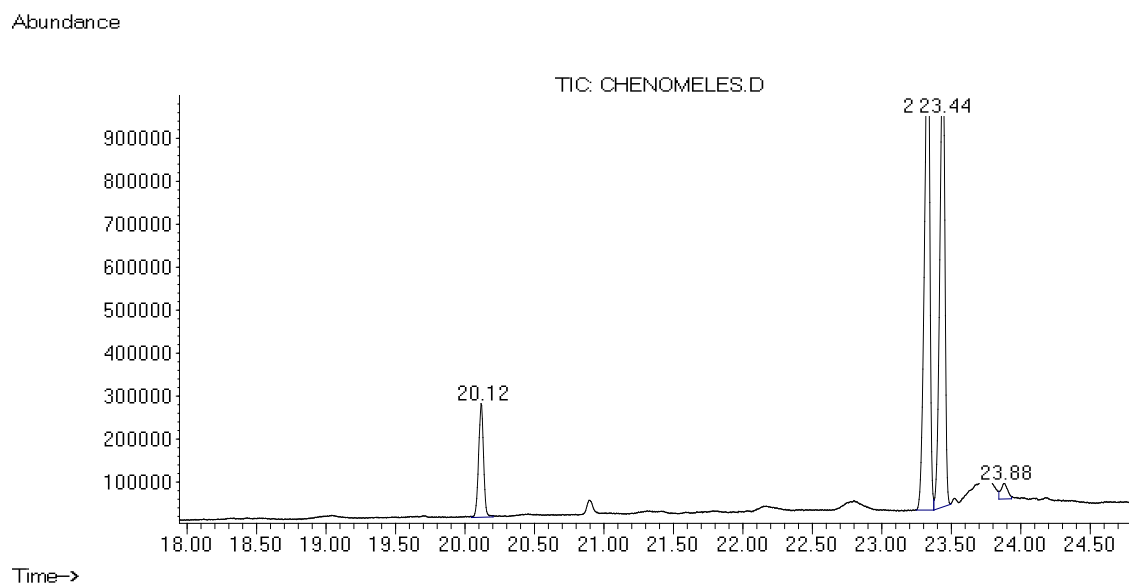


Рис. 7. Компонентный состав жирного масла семян хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Жирнокислотный состав масла семян представлен четырьмя основными жирными кислотами, из которых 88,3% приходится на линолевую и олеиновую, 1,85% - на стеариновую кислоту и 9,88% - на пальмитиновую кислоту (табл. 17).

Таблица 17

Состав жирного масла плодов хеномелеса (*Chaenomeles Lind.*)

Жирная кислота	Содержание в масле, %
пальмитиновая кислота (16:0)	9,880
линолевая кислота (18:2)	47,009
олеиновая кислота (18:1)	41,263
стеариновая кислота (18:0)	1,848

Хорошо выраженные различия в составе и свойствах жирных масел семян используют в биохимической характеристике систематики растений. Климатическая теория маслообразовательного процесса различает следующие типы растительных жиров: тропические, с преобладанием насыщенных жирных кислот; твердые (масла различных пальм); средиземноморские – с преобладанием олеиновой кислоты (арахис, маслины, кунжут) и жиры с увеличивающимся содержанием линолевой кислоты (хлопчатник); жирные масла растений северной и умеренной зон с высоким йодным числом, причем с продвижением одного и того же растения к северу йодное число увеличивается. Согласно этой теории, жирное масло семян исследуемых образцов хеномелеса следует отнести к группе средиземноморских растений.

Выводы

1. Определен состав и содержание химических веществ 25 сортообразцов хеномелеса коллекции НБС-ННЦ.
2. Дана сравнительная характеристика сортообразцов хеномелеса по накоплению в плодах сахаров, аскорбиновой кислоты, фенольных веществ, соотношению двух форм фенольных веществ – флавонолов и катехинов.
3. Установлен состав и содержание химических веществ в листьях хеномелеса. Они могут быть использованы в качестве нового источника биологически активных веществ.
4. Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировано свыше 80 химических веществ в составе плодов хеномелеса.
5. Идентифицировано 22 летучих компонента эфирного масла кожицы плодов хеномелеса.
6. Выделено жирное масло из семян хеномелеса, дана его физико-химическая характеристика, установлен жирно-кислотный состав.
7. По комплексу помологических и биохимических признаков выделено 6 сортообразцов хеномелеса, перспективных для дальнейшего испытания.

Список литературы

1. ГОСТ 24556-89. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С.
2. ГОСТ 25555.0-82. Продукты переработки плодов и овощей. Методы испытаний.
3. ГОСТ 28038-89. Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб.
4. ГОСТ 28562-90. Продукты переработки плодов и овощей. Рефрактометрический метод определения растворимых сухих веществ.
5. ГОСТ 40418-96. Масла растительные. Метод определения жирно-кислотного состава. ГОСТ 51483-99. Масла растительные и жиры животные.
6. ГОСТ 51483-99. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме.
7. ГОСТ 8756.1-79. Продукты пищевые консервированные. Методы определения органолептических показателей, массы нетто или объема и массовой доли составных частей.
8. Дорофеев А.Н., Хорт Т.П., Русина И.Ф., Хмельницкий Ю.В. Поиск антиоксидантов растительного происхождения и перспективы их использования // Сб. науч. тр. «Биологически активные вещества растений». Ялта, 1989. - С. 42-52.
9. Методы биохимического исследования растений / Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И. и др. – Л.: Колос, 1972. – 447 с.
10. Комар-Темная Л.Д., Тарахтиев С.И. Значение и возможности использования некоторых редких плодовых культур в лечебно-профилактическом питании // Materials of the 7 international conference in horticulture. Lednice, Czech Republic, 1999. – P. 72-75.
11. Комар-Темная Л.Д., Остапко И.Н., Закотенко С.Н. Элементный состав плодов *Chaenomeles* Lindl. // Современные научные исследования в садоводстве. Материалы VIII международной конференции по садоводству. Часть 2. – Ялта, 2000. – С. 71-76.
12. Komar-Tyomnaya L.D., Richter A.A. Perspective of *Chaenomeles* breeding in Crimea // 9 International Conference of Horticulture. Lednice, Czech Republic. - 2001. – Vol. 1. – P.101-105.
13. Комар-Темная Л.Д., Рихтер А.А., Темная Л.Д. Преемственность идей Л.П.Симиренко о культуре хеномелеса в Крыму // Материали науково-практичної конференції „Кримське плодівництво: минуле, сьогоднішня, майбутнє”. – Сімферополь: Таврія, 2004. – С.193-2001.
14. Lesinska, E. Characteristic of East Asian quince fruits' chemical composition and estimation of their technologic usability for fruit and vegetable processing (in Polish). Zeszyty naukowe akademii rolniczej im Hugona Kollataja w Krakowie, Doctoral thesis. – 1986. – 100:1-118.

15. Lesinska, E. Characteristics of sugars and acids in the fruits of East Asian quince // *Die Nahrung*.-1987.-31:763-765.
16. Lesinska E. Some volatile and non volatile components of the dwarf quince (*Chaenomeles japonica*) // *J. Food Sci.* – 1988. – Vol. 53 – P. 854-856.
17. Lesinska E., Kraus D. Up to date knowledge on cultivation of *Chaenomeles* and processing of its fruits in Poland. Rpt. 1992-1994, Balsgerd-Dept. Hort. Plant Breeding. Swedish Univ. Agr. Sci. – 1996. – P. 187-192.
18. Меженский В.Н. Хеномелес. - АСТ-Сталкер, 2004. – 63 с.
19. Методы биохимического исследования растений / Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
20. Недвига О.М. Біоecологічні особливості хеномелесу японського і перспективи його культивування в Лісостепу України: Автореф....канд. биол. наук. 03.00.05 – К., 1994. – 23 с.
21. Петрова В.П. Дикорастущие плоды и ягоды. – М.: Лесная промышленность, 1987. – С. 172-175.
22. Пономаренко Н.С. Биологические особенности и внутривидовая изменчивость *Chaenomeles japonica* (Tunb.) Lindl. ex Spach в Молдавии: Автореферат дисс. к.б.н. 03.00.05. – Кишинев, 1990. – 18 с.
23. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Хеномелес. – Орел, 1999 – С.473-480.
24. Ратомските Г.С. Биологические особенности хеномелеса японского и перспективы его возделывания в Литовской ССР: Автореф. канд. биол. наук. 03.00.05 – К., 1982. – 23 с.
25. Ruissa S. Studies on Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) in Latvia// Rpt. 1992-1994, Balsgerd-Dept. Hort. Plant Breeding. Swedish Univ. Agr. Sci., 1996. – P. 204-206.
26. Rumpunen K. *Chaenomeles*: Potential new fruit crop for Northern Europe // *Trends in new crops and new uses* / Eds. J. Janick and A. Whipkey. - Alexandria, VA: ASHS Press, 2002. – P. 385-392.
27. Руководство по методам исследования и технологическому контролю и учету производства в масложировой промышленности / Под ред. В.П. Ржехина, Л.С. Сергеева. – Л.: Пищевая промышленность. – 1973. – 530 с.

Biologically-active substances of *Chaenomeles* Lindl. in connection with prospects of its industrial cultivation

Ezhov V.N., Polonskaya A.K., Komar-Tyomnaya L.D., Voloshina I.V., Vinogradov B.A.

The comparative characteristic of 16 *Chaenomeles* seedlings on accumulation of sugars, ascorbic acid, phenols in fruits is given. The structure and contents of chemical substances in leaves of *Chaenomeles* is determined. More than 80 chemical substances in structure of *Chaenomeles* fruits and 22 essential components of oil are identified by the method of chromatomass-spectrometry. The physico-chemical characteristic of greasy oil from *Chaenomeles* seeds is given, greasy acids composition is established. On a complex of pomological and biochemical characteristics 6 *Chaenomeles* seedlings, perspective for the further test have been selected.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ КАЛАДИУМА (*CALADIUM HORTULANUM* BIRDSEY.) ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОРГАНОГЕНЕЗ

И.В. МИТРОФАНОВА¹, кандидат биологических наук;
М.К. СОКОЛОВА²;

О.В. МИТРОФАНОВА¹, доктор биологических наук;
Н.Н. ИВАНОВА¹, С.В. ЧЕЛОМБИТ¹

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

В настоящее время биотехнологические методы активно используются для размножения ряда декоративных растений [8, 16]. В качестве исходных эксплантов используют вегетативные почки, листья и другие органы донорных растений. Изучая пути морфогенеза растений в условиях *in vitro*, можно выявить определенные сходства или различия в регенерационном потенциале исследуемых органов и тканей и выделить оптимальные из них.

Каладиум (*Caladium hortulanum* Birdsey.) относится к семейству ароидных и очень популярен среди декоративных растений. Эту культуру в последние годы широко используют для озеленения зимних садов, а также в качестве водного растения в парках и садах в летний период. Однако, известно, что каладиум очень трудно размножается традиционными методами [7].

Первые работы по культуре тканей *C. hortulanum* появились в начале 70-х годов прошлого столетия, но касались они только изучения вирусов этой культуры и использования культуры меристем для оздоровления [13]. Отдельные публикации о разработке способа не прямой регенерации растений каладиума в условиях *in vitro* появились значительно позже [3, 12, 17]. Несколько лет назад американские ученые обратили внимание на возможности селекции *in vitro* каладиума. Они проростили пыльцу этого растения и научились в течение короткого времени сохранять ее в условиях *in vitro* [10]. Впервые изучением вопросов соматического эмбриогенеза *in vitro* каладиума начали заниматься в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [4]. Разработка данного способа размножения позволила получать полноценные растения шести сортов каладиума.

Однако результаты всех работ, проводимых с культурой каладиума, показали, что до сих пор не выявлены морфогенетические потенции органов и тканей различных сортов каладиума в условиях *in vitro* и соответственно не разработаны эффективные биотехнологические системы регенерации этого трудноразмножаемого растения.

Целью настоящего исследования было изучение возможных путей регенерации растений каладиума (*C. hortulanum*) в условиях *in vitro* через соматический эмбриогенез и органогенез с последующей разработкой способа микроразмножения *in vitro* данной культуры.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей каладиума выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра в 2001-2005 гг. Гистохимические исследования проведены в лаборатории физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия).

Для исследований были отобраны два сорта:

а) сорт Pink Gem – среднерослый, черешок листа полосатый, лист темно-зеленый с бело-красной окантовкой и прожилками. Растение достаточно кустистое, образует в среднем 10 листьев размером до 20 см в длину и до 10-15 см в ширину. Период вегетации – с апреля по ноябрь;

б) сорт *Triumphe de Compte* – сильнорослый, черешок листа темно-коричневый, пятнистый, лист темно-зеленый с красными прожилками и белыми пятнами. Растение образует 3-4 листа размером 35 см в длину и 25 см в ширину. Период вегетации – с апреля по октябрь.

В качестве исходных эксплантов были использованы листья с черенками с 2-3-летних растений, выращиваемых в закрытом грунте из коллекции НБС–ННЦ, которые отбирали в период с мая по сентябрь.

Для стерилизации растительных эксплантов использовали различные антисептики, такие как 70%-ный этиловый спирт (C_2H_5OH), 1% и 1,8%-ные растворы гипохлорита натрия ($NaClO$), 0,08%-ный раствор $AgNO_3$, 1%-ный раствор Thimerosal (*Sigma*, США). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента Tween-80 (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «Fatran Lf» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [15]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамин-НСI, 2,43 мкМ пиридоксин-НСI, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* каладиума в питательную среду добавляли 1,36-5,56 мкМ зеатина, 1,0-9,0 мкМ тидиазурона (ТДЗ, *Sigma*, США), кинетин (*Sigma*, США) в концентрации 1,39-4,60 мкМ и 5,37 мкМ α -нафтилуксусной кислоты (НУК, *Sigma*, США), 6-бензиламинопурин (БАП, *Sigma*, США) в концентрации 0,89-4,40 мкМ и 1,07-5,37 мкМ НУК, 0,98-2,48 мкМ β -индолил-3-масляной кислоты (ИМК, *Sigma*, США).

Высечки листа культивировали в термостате при температуре 25 °С в отсутствие освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре 24 ± 1 °С, интенсивности освещения 40 мкМ $m^{-2} c^{-1}$ и 16-часовом фотопериоде.

Субкультивирование тканей и органов проводили через 30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при -20 °С, после чего заливали в ПЭГ-1500 [2, 5, 6].

Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон. При окраске акридиновым оранжевым: срезы доводили до воды; на срезы наносили 0,1%-ный водный раствор акридинового оранжевого на 2–3 мин; промывали дистиллированной водой. При окраске толуидиновым синим: срезы окрашивали 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего (2–3 мин); промывали в дистиллированной воде. При окраске DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indole. (*Sigma*, США) – флуоресцентный краситель на ядерную ДНК: срезы доводили до воды; окрашивали DAPI в течение 10 мин; промывали дистиллированной водой. Затем срезы подсушивали и заключали в синтетическую среду DePex (*Serva*, Германия).

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DMLB» (Германия).

Результаты и обсуждение

Известно, что правильный выбор первичного экспланта, способа стерилизации, применение экзогенных регуляторов роста, условия культивирования позволяют регулировать морфогенетические процессы в культуре органов и тканей и получать желаемый результат. В качестве первичных эксплантов были использованы высечки листа и сегменты черешков каладиума сортов *Pink Gem* и *Triumphe de Compte*. Отбор листьев с черешками исследуемых сортов каладиума, а также их введение в культуру *in vitro* проводили с началом появления нормальных листьев взрослого растения (май) и в период его вегетации по сентябрь включительно. Было установлено, что листья, отобранные в период с мая по июль, были наиболее морфогенными, при этом частота образования соматических зародышей достигала 86-100% (рис. 1). В последующие месяцы этот показатель значительно снижался.



Рис. 1. Зависимость частоты образования соматических зародышей каладиума сортов Pink Gem и Triumphe de Compte от времени отбора исходного экспланта

Одной из основных проблем, препятствующих успешному применению биотехнологических методов в размножении растений, является стерилизация исходного растительного материала эксплантов для получения асептической культуры. Трудности, возникающие при стерилизации, преодолеваются чаще всего за счет повторной стерилизации, предварительно проверяя экспланты на зараженность сапрофитной микрофлорой, или в питательные среды вводят антибиотики [11]. Нам удалось освободить исходный материал от экзогенной бактериальной и грибной инфекции, применяя метод последовательной стерилизации в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ном этаноле (1 мин). В таблице 1 представлены результаты исследований по стерилизации исходного материала каладиума с помощью различных антисептиков. Увеличение экспозиции при обработке в 1,8%-ном растворе NaClO до 10 мин приводило к 100%-ной стерилизации эксплантов, однако в дальнейшем такие экспланты не развивались. Присутствие в качестве антисептиков нитрата серебра и Thimerosal способствовало выходу $79,3 \pm 5,3\%$ стерильных эксплантов, однако их воздействие вызывало сильный ожог тканей, что значительно снижало их морфогенетический потенциал и последующую частоту регенерации микропобегов.

Таблица 1

Результаты стерилизации эксплантов каладиума сортов Pink Gem и Triumphe de Compte

Способ стерилизации	Количество эксплантов, свободных от контаминации, %
1% NaClO (5 мин) → 70% C ₂ H ₅ OH (1 мин)	47,2 ± 8,4
1% NaClO (10 мин) → 70% C ₂ H ₅ OH (1 мин)	78,6 ± 6,3
1,8% NaClO (5 мин) → 70% C ₂ H ₅ OH (1 мин)	96,5 ± 10,7
1,8% NaClO (10 мин) → 70% C ₂ H ₅ OH (1 мин)	100,0 ± 0,0
70% C ₂ H ₅ OH (1 мин) → 1% Thimerosal (20 мин) → 0,08% AgNO ₃ (2 мин)	26,3 ± 1,9
70% C ₂ H ₅ OH (1 мин) → 1% Thimerosal (20 мин) → 0,08% AgNO ₃ (3 мин)	79,3 ± 5,3

В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды MC (C1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Нами было отмечено, что использование зеатина не оказывало индуцирующее действие как на процессы дедифференциации, так и дифференциации тканей листа. В присутствии ТДЗ формировался

рыхлый каллус по периметру высечки листа. Среди испытанных концентраций кинетина оптимальной оказалась 2,32 мкМ, при которой формировались соматические зародыши на 66,67% и 70,78% листовых дисков у сортов Pink Gem и Triumphe de Compte соответственно (табл. 2). Повышение концентрации кинетина до 3,25 мкМ в два раза уменьшало количество эксплантов, способных к соматическому эмбриогенезу. Дальнейшее повышение концентрации кинетина индуцировало активное каллусообразование по краю культивируемых эксплантов.

Таблица 2

Образование соматических зародышей в культуре листовых дисков и черешков двух сортов каладиума на средах С1, дополненных различными концентрациями кинетина и 5,37 мкМ НУК

Концентрация кинетина, мкМ	К-во эксплантов с соматическими эмбриоидами, %			
	культура листовых дисков		культура черешков	
	Pink Gem	Triumphe de Compte	Pink Gem	Triumphe de Compte
1.39	7,80 ± 2,83	14,33 ± 3,69	6,54 ± 2,61	12,56 ± 3,49
2,32	66,67 ± 6,11	70,78 ± 5,86	50,00 ± 6,25	41,68 ± 6,42
3,25	32,22 ± 4,93	38,09 ± 5,12	20,80 ± 4,28	20,92 ± 4,29
4,60	14,29 ± 3,69	18,73 ± 4,11	8,28 ± 3,60	5,00 ± 2,80

Вычлняя высечки листа размером 10 x 10 мм из разных зон только что раскрывшейся листовой пластинки и помещая их на питательную среду с кинетином, удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямому соматическому эмбриогенезу. Это зоны соединения листовой пластинки с черешком и край высечки листа (рис. 2).

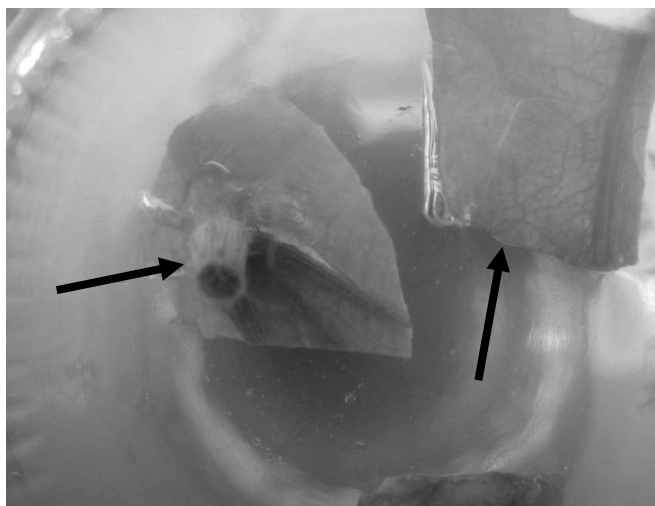


Рис. 2. Зоны листовой пластинки каладиума, способные к морфогенезу в условиях *in vitro*

Период развития от введения первичных эксплантов обоих сортов каладиума в культуру до появления глобулярных структур по краю высечки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток (рис. 3, а, б).

В процессе исследований было также установлено, что путь реализации морфогенетического потенциала эксплантов зависел от условий культивирования. Так, в термостате формировались только соматические зародыши. Образование 2-3 корней в процессе развития эмбриоида было его отличительной особенностью (рис. 4).

Из таблицы 3 видно, что корни активно развивались как у сорта Pink Gem, так и Triumphe de Compte. Особых различий в количестве и длине корней у соматических зародышей, образовавшихся из высечек листа и сегментов черешка, отмечено не было. Однако корни у эмбриоидов, развивающихся из листа, были мощнее и имели корневые волоски.

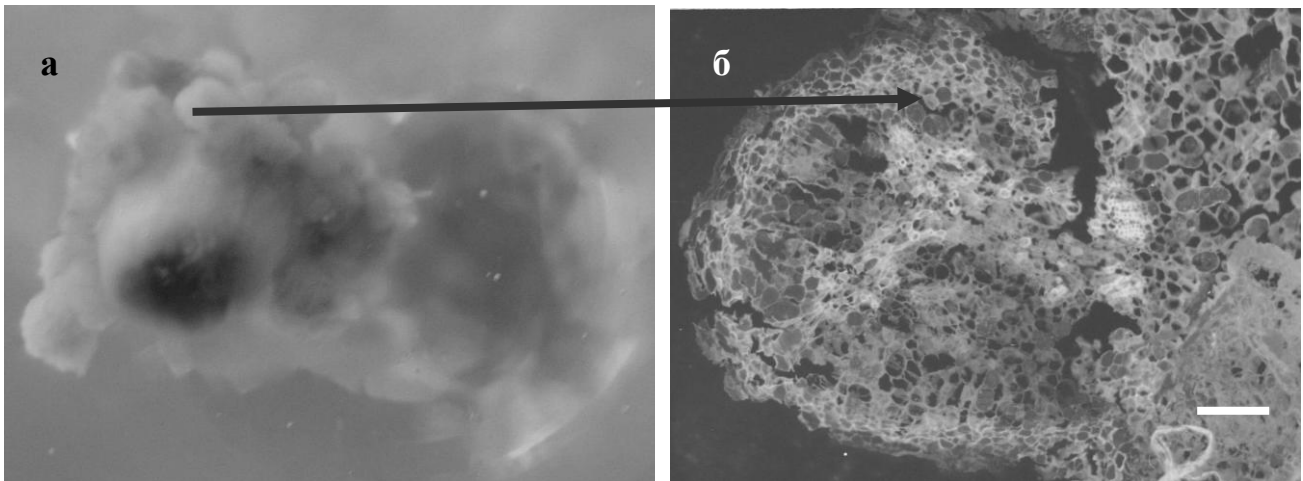


Рис. 3. Формирование глобулярных эмбрионов в эпидермальной части высечки листа каладиума: а) глобулярные структуры в зоне черешка; б) микрофотография проэмбрио (10 микрон)



Рис. 4. Развитие 2-3 корней у соматических зародышей каладиума при культивировании в темноте

Таблица 3

Развитие корней соматических зародышей двух сортов каладиума на среде С1, дополненной 2,32 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК после культивирования в термостате при температуре 25 °С

Сорт	Культура листовых дисков		Культура черешков	
	среднее к-во корней / эмбрионд, шт.	средняя длина корней, см	среднее к-во корней / эмбрионд, шт.	средняя длина корней, см
Pink Gem	2,85 ± 0,25	1,85 ± 0,24	2,00 ± 0,24	1,45 ± 0,22
Triumphe de Compte	3,00 ± 0,27	2,40 ± 0,25	2,20 ± 0,20	2,10 ± 0,21

На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, не прямой и прямой соматический эмбриогенез. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальной и субэпидермальной зоне высечки листа (рис. 5). В течение последующих 30 суток наблюдали развитие полноценных соматических зародышей (рис. 6). В присутствии

кинетина в питательной среде С1 в концентрации 2,32 мкМ и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбриоидов на эксплант достигало $10 \pm 1,4$ штук.

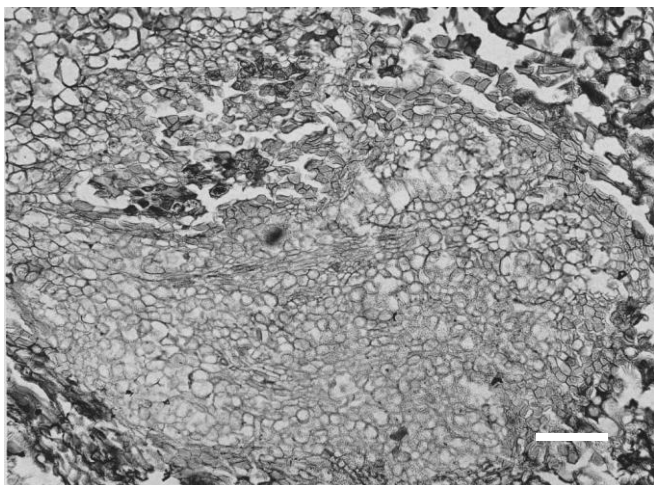


Рис. 5. Развитие соматического зародыша каладиума в субэпидермальной зоне высечки листа

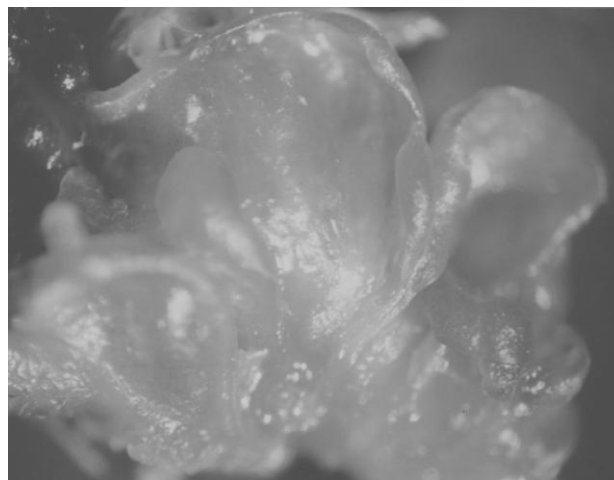


Рис. 6. Соматические зародыши каладиума на питательной среде С1

Последующие passages соматических зародышей на питательную среду С1 индуцировали вторичный эмбриогенез. Вторичные эмбриоиды формировались непосредственно на первичных соматических зародышах. На рисунке 7 показан процесс образования вторичного эмбриоида, в то время как первичный начинает прорастать на поверхности высечки листа. На рисунке хорошо видно, что зародыш состоит из активно делящихся клеток.

В процессе исследований было отмечено, что на индукционной среде растения развивались очень медленно, поэтому для массового образования растений из эмбриоидов концентрацию НУК уменьшали в 10 раз. При таких условиях частота регенерации не уменьшалась и развивались полноценные растения (рис. 8). Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца.

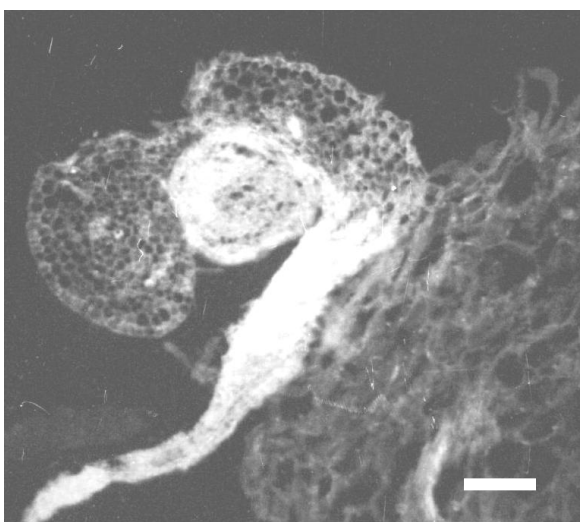


Рис. 7. Вторичный эмбриогенез каладиума на питательной среде С1



Рис. 8. Регенеранты каладиума, полученные из соматических зародышей через прямой эмбриогенез

Из литературных данных известно, чтобы вызвать прямую и непрямую регенерацию растений из листовых эксплантов очень часто используют питательные среды, в которых соотношение ауксина и цитокинина равняется 1:1 [1, 9, 14].

При культивировании высечек листа каладиума на средах с БАП и НУК соматические зародыши формировались в каллусе, образовавшемся по краю высечки листа. Наряду с этим, было отмечено различие в особенностях органогенеза двух сортов каладиума. Так, меристемоиды, из которых затем развивались адвентивные почки, у сорта Pink Gem формировались в образующемся каллусе. При этом у сорта Triumphe de Compte адвентивные почки развивались непосредственно по краю высечки листа без этапа каллусообразования. В результате проведенных исследований установлены оптимальные концентрации фитогормонов (2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК – питательная среда С2), индуцирующие образование максимального количества микропобегов и эмбриоидов (табл. 4). Увеличение концентрации фитогормонов приводило к снижению регенерационного потенциала и оводнению образовавшихся микропобегов.

Таблица 4

Регенерация микропобегов и соматических зародышей каладиума на средах с БАП и НУК

Концентрация БАП и НУК, мкМ	Среднее к-во микропобегов на эксплант, шт.		Среднее к-во соматических эмбриоидов на эксплант, шт.	
	Pink Gem	Triumphe de Compte	Pink Gem	Triumphe de Compte
0,89 + 1,07	0	1,5 ± 0,5	0	0
2,22 + 2,69	13,7 ± 4,3	15,5 ± 3,5	3,6 ± 0,2	7,2 ± 1,3
3,55 + 4,30	7,9 ± 2,6	9,5 ± 1,5	2,8 ± 0,4	6,2 ± 0,6
4,40 + 5,37	2,6 ± 0,3	3,0 ± 0,6	1,3 ± 0,3	3,5 ± 0,3

В том случае, когда путь развития экспланта реализовался через органогенез, в течение 20-30 суток на эксплантах образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. После этапа каллусообразования через 14 суток культивирования отмечали появление меристемоидов. На 21 сутки регенерировали микропобеги (рис. 9), а в течение последующих 14 суток появлялись корни и развивались полноценные растения (рис. 10). После отделения каллуса от регенерантов и их декапетирования, в их основании активно закладывались адвентивные почки. Количество адвентивных микропобегов достигало в среднем 15-20 штук на эксплант.

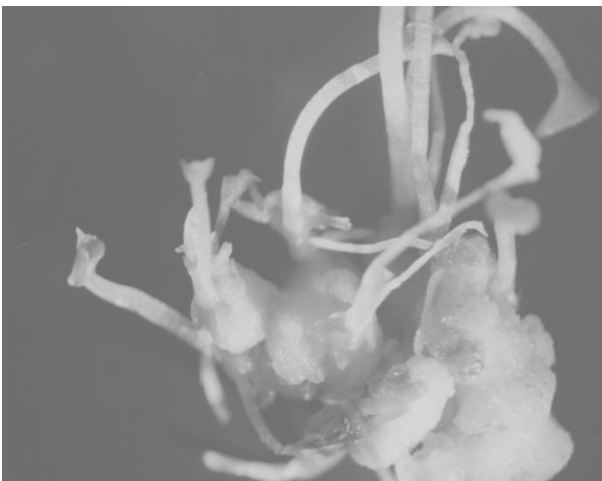


Рис. 9. Регенерация микропобегов в каллусе каладиума на 21 сутки культивирования высечек листа



Рис. 10. Регенеранты каладиума, полученные в результате органогенеза из высечек листа

Образование соматических зародышей в эмбрионном каллусе также происходило на питательной среде С2. Однако появление эмбриоидов было отмечено на 7 сутки после образования каллуса. При таком способе формирования эмбриоидов для глобулярных зародышей была характерна более насыщенная зеленая окраска. Процесс формирования

соматических зародышей был асинхронный: в одно и тоже время появлялись новые эмбриониды и развивались растения (рис. 11). Регенеранты легко отделялись от самого каллуса и их высаживали на адаптацию *in vivo* или доращивали на питательной среде с 0,02 мкМ НУК.

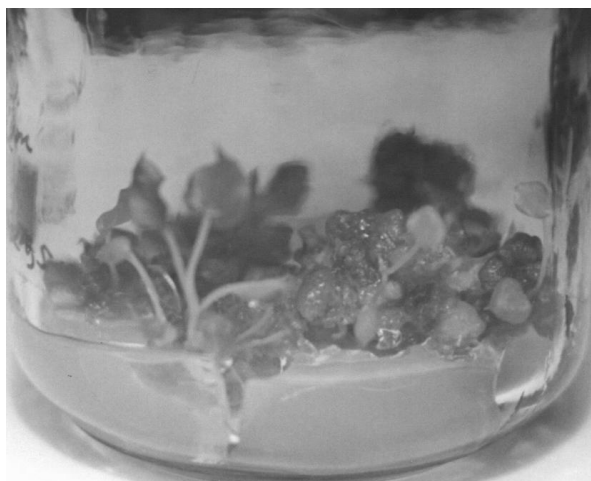


Рис. 11. Развитие растений в эмбриогенном каллусе каладиума

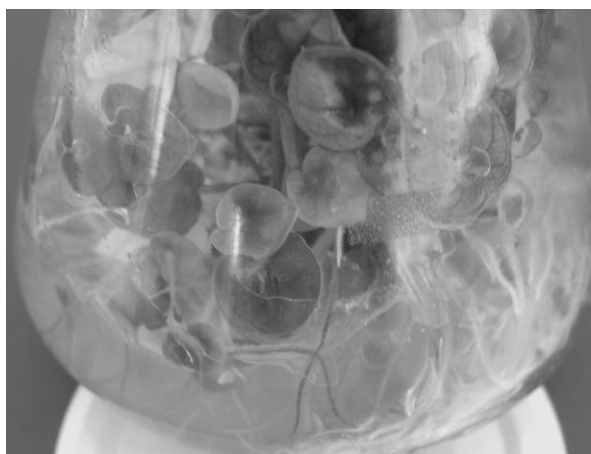


Рис. 12. Растения каладиума перед высадкой на адаптацию *in vivo*

Путем прямой регенерации микропобегов при последовательных субкультивированиях из одного экспланта в течение года можно получить до $5 \cdot 10^6$ микропобегов. Для укоренения микропобегов каладиума использовали ИМК в концентрации 0,98-2,48 мкМ. Среднее количество корней на эксплант достигало 4,5 штук (рис. 12).

В результате соматического эмбриогенеза из одной высадки листа можно получить более $10 \cdot 10^6$ растений, исключая затраты на стадию укоренения.

На адаптацию растения высаживали как группами, так и отдельно в кассеты объемом 100 мл фирмы «ENGO» (Дания) и накрывали полиэтиленовыми изоляторами, которые не снимали с растений в течение 2-3 недель. Это было обусловлено необходимостью 100% относительной влажности на этапе перехода растения из условий *in vitro* в условия *in vivo*. Затем изоляторы постепенно снимали на 20-30 мин, снижая влажность до 80%. Несоблюдение этих требований приводило к 80-90% гибели регенерантов в условиях *in vivo*.

Было установлено, что растения начинали расти полностью без изоляторов через 5 недель адаптации после высадки в субстрат. Количество адаптированных растений зависело, прежде всего, от состава стерильного субстрата, в который

высаживали регенеранты из условий *in vitro* (табл. 5).

Таблица 5

Результаты адаптации пробирочных растений двух сортов каладиума на различных стерильных субстратах

Тип стерильного субстрата	К-во адаптированных растений, %	
	Pink Gem	Triumphe de Compte
торф:песок (3:1)	90,67 ± 0,75	94,42 ± 0,76
торф:песок (2:1)	64,51 ± 1,44	75,87 ± 2,45
торф:песок (1:1)	25,37 ± 0,75	28,30 ± 0,21
торф:лиственная земля:песок (1:1:1)	44,11 ± 0,93	40,13 ± 0,75
перлит	90,44 ± 0,47	96,02 ± 1,79

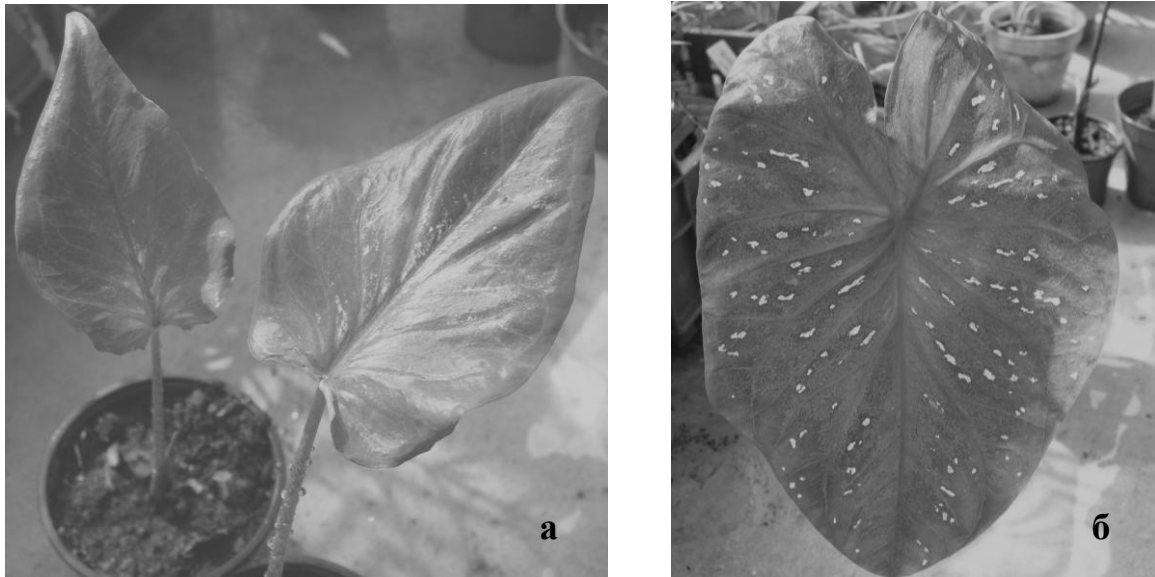


Рис. 13. Адаптированное растение каладиума сорта Triumph de Compte: а) через месяц после адаптации; б) через 4 месяца после адаптации

Эффективность адаптации регенерантов каладиума в торфе и песке (3:1), а также в перлите составила 90–96%. Сорт каладиума Triumph de Compte, высаженный на адаптацию в марте, через 4 месяца достигал стандартных размеров: высота растения около 30 см, длина листа 20–25 см, ширина листа 15–17 см (рис. 13).

Таким образом, нами установлены оптимальные сроки отбора листьев каладиума (май–июль) для введения в условия *in vitro*. Показано, что в результате применения 1,8%-ный раствора гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ного этанола (1 мин) получено 96,5% эксплантов, свободных от контаминации. На основе изучения действия экзогенных факторов (кинетина и НУК) на реализацию морфогенетического потенциала высечек листа сортов каладиума Triumph de Compte и Pink Gem определены основные пути регенерации растений и разработаны биотехнологические системы соматического эмбриогенеза и органогенеза в условиях *in vitro*.

На схеме представлены 4 пути получения регенерантов каладиума (рис. 14).

Первый путь – прямой соматический эмбриогенез, включающий в себя ряд последовательных этапов: а) индукция образования соматических зародышей из клеток, детерминированных к образованию биполярных структур на питательной среде С1, дополненной 2,32 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК в термостате при температуре 25 °С; б) прорастание соматических зародышей и развитие растений, на среде С1 с уменьшенной в 10 раз концентрацией НУК; в) прямой вторичный эмбриогенез из соматических зародышей и из основания проростков; г) регенерация растений на той же среде, что и индукция развития эмбриоидов.

Второй путь – непрямой соматический эмбриогенез, при котором клетки высечки листа, культивируемые на питательной среде С2 с 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК, на свету сначала дедифференцировались, образуя каллус, затем дифференцировались и в каллусе начинался процесс образования соматических зародышей. Из эмбриоидов образовывались полноценные растения на среде С2, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,02 мкМ НУК.

Третий путь – прямая регенерация микропобегов у сорта Triumph de Compte происходила также на свету на питательной среде С2, содержащей 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. Укоренение микропобегов осуществляли на среде ½ МС, дополненной 0,98–2,48 мкМ ИМК.

Четвертый путь – непрямая регенерация микропобегов у сорта Pink Gem. На среде С2 с 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК на свету сначала формировался морфогенный каллус, а затем закладывались меристемойиды и развивались адвентивные микропобеги. Укоренение

микропобегов осуществляли на той же среде, что и в случае третьего пути регенерации. Все четыре пути регенерации растений каладиума заканчивались адаптацией пробирочных растений *in vivo*.

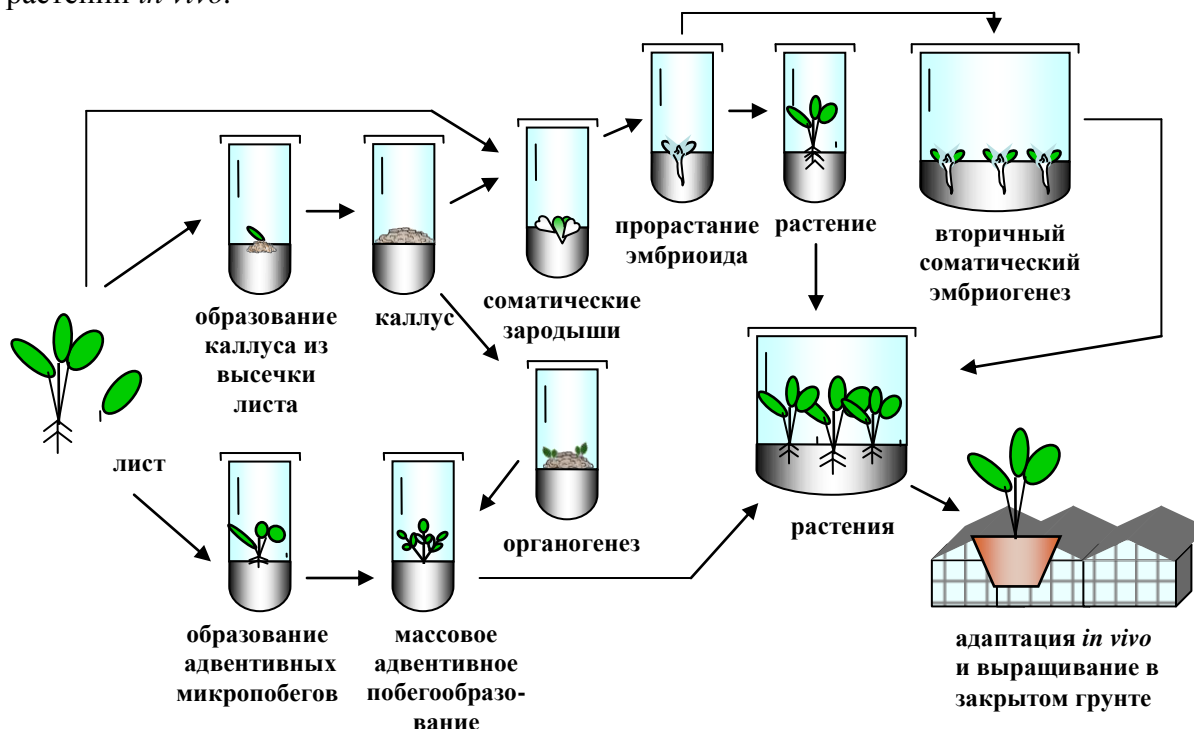


Рис. 14. Биотехнологическая схема регенерации растений каладиума в условиях *in vitro*

Сравнительная характеристика результатов традиционного размножения и микроразмножения в условиях *in vitro* представлена в таблице 6. Как видно из таблицы, регенерация растений каладиума *in vitro* позволяет получать значительно больше растений по сравнению с традиционным размножением. По нашему мнению, наиболее эффективным среди четырех вышеуказанных путей регенерации растений каладиума является первый, в котором происходят последовательно два процесса: прямой первичный и вторичный соматический эмбриогенез. Так, количество растений в год, при использовании первого пути регенерации *in vitro*, составляет 40.000.000 штук, а при традиционном – 1-2 штуки от одного растения.

Таблица 6

Результаты размножения растений каладиума

Путь регенерации*	Исходный эксплант	К-во растений, полученных из одного экспланта в условиях <i>in vitro</i> , шт.	К-во растений в год при размножении <i>in vitro</i> , шт.	К-во растений в год при традиционном размножении, шт.
1	лист	10	40 000 000	1-2
2		7	10 000 000	
3		15	20 000 000	
4		3	5 000 000	

* 1 – прямой соматический эмбриогенез; 2 - непрямой соматический эмбриогенез; 3 - прямая регенерация микропобегов; 4 – непрямая регенерацию микропобегов

Все растения, полученные из высечек листа через прямой соматический эмбриогенез и прямой органоогенез и выращиваемые в теплице, фенотипически не отличались от донорных. Наряду с этим, как результат непрямого соматического эмбриогенеза у сорта *Triumphe de Compte*, непрямого регенерации микропобегов и непрямого соматического

эмбриогенеза у сорта Pink Gem, были получены новые формы с различными соматическими мутациями, которые были выделены при выращивании растений в закрытом грунте. У выделенных форм соматические мутации проявлялись в виде различных форм листовой пластинки, ее окраски и жилковании.

Список литературы

1. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной [*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson] // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 111-126.
2. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
4. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Пути реализации морфогенетического потенциала каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) и цветной каллы (*Zantedeschia hybrida*) в условиях *in vitro* // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 64-67.
5. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
6. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высшая школа, 1960. – 205 с.
7. Чуб В., Лезина К. Все о комнатных растениях. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2002. – 336 с.
8. Biotechnology of Ornamental Plants / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.
9. Caboni E., Tonelli M.G. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18, N 12. – 985-988.
10. Deng Z., Harbaugh B.K. Technique for *in vitro* pollen germination and short-term pollen storage in caladium // HortSci. – 2004. – Vol. 39. – P. 365-367.
11. Dodds J.H., Roberts L.W., Heslop-Harrison J. Experiments in Plant Tissue Culture. 3rd Ed. – UK: Cambridge University Press., 1995. – 272 p.
12. Gliozzeris S., Tamosiunas A., Stuopyte L. Effect of BAP and 2,4-D on *in vitro* regeneration of some cultivars of *Caladium hortulanum* // Plant Tissue Culture: Abstracts 4th Intl. Conf. (1-3 Nov. 2001, Dhaka). – Dhaka, 2001. – P. 26.
13. Hartman R.D. Dasheen mosaic virus and other phytopatogen eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips // Phytopath. – 1974. – Vol. 64. – P. 237-240.
14. Mathews V.H., Rangan T.S. Growth and regeneration in callus cultures of pineapple // Sci. Hort. – 1981. – Vol. 14, N 3. – P. 227-234.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
16. Naik P.K., Nayak S. Different modes of plant regeneration and factors affecting *in vitro* bulbet production in *Ornithogalum virens* // Science Asia. – 2005. – Vol. 31. – P. 409-414.
17. Tamosiunas A., Gliozzeris S., Stuopyte L. Prospects for micropropagation of *Caladium* as pot plants production // Plant Tissue Culture: From Theory to Practice: Abstracts Intl. Conf. of Baltic States (27-28 May 2004, Salaspils, Latvia). – Salaspils, 2004. – P. 61.

Biotechnological system of caladium (*Caladium hortulanum* Birdsey.) plants obtaining via somatic embryogenesis and organogenesis

Mitrofanova I.V., Sokolova M.K., Mitrofanova O.V., Ivanova N.N., Chelombit S.V.

On the basis of somatic embryogenesis and organogenesis of caladium the biotechnological system of plants obtaining regeneration has been developed. Influence of kinetin and BAP concentration on inducing of somatic embryo and adventive buds formation has been investigated. The adaptation conditions *in vivo* of plants have been demonstrated.

КУЛЬТУРА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *YUSSA* L.

П.А. КАРПОВ, кандидат биологических наук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ

Род *Yucca* L. насчитывает около 42 видов древесных однодольных растений, произрастающих в Северной Америке. Представители рода *Yucca* являются ценными декоративными растениями, источниками природного волокна, а также природным источником стероидных гликозидов, являющихся основой для синтеза медицинских препаратов стероидного ряда, таких как кортизон и половые гормоны [18, 38].

Представители р. *Yucca* – медленнорастущие растения, с выраженной периодичностью цветения, основным способом размножения которых является семенная репродукция, тесно связанная с деятельностью опылителей - юкковых молей, имеющих специализацию на уровне отдельных родов, подродов, экологических групп и видов [14, 16, 28]. В условиях интродукции на юге Украины из-за отсутствия естественных опылителей, юкки оказываются не способными к завязыванию плодов без применения принудительного опыления. Исключение составляет способная к самоопылению *Y. aloifolia* [2, 6, 7, 11]. Это является основной причиной, по которой в настоящее время преобладают методы вегетативного размножения *Yucca* sp., отличающиеся низкой эффективностью [39]. Наряду с разработкой и совершенствованием методов искусственного опыления, которое значительно затруднено периодичностью цветения, а в случае с крупными видами, сложностью самой процедуры опыления [1, 7], актуальна разработка методов клонального микроразмножения представителей рода *Yucca in vitro* [37].

Индукция адвентивного побегообразования

In vitro быстрое размножение представителей рода *Yucca* L. чаще всего достигается посредством индукции закладки адвентивных почек [19, 25, 26].

Роберт с соавторами [37] обнаружили, что при индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов, в случае с представителями семейства *Agavaceae*, обязательным условием является совместное действие низкой концентрации ауксина и высокой концентрации цитокинина [12]. Так, в Флоридском университете добились массового получения растений *Yucca* sp. через закладку придаточных почек на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП) [26].

При проращивании семян *Y. schidigera* Roezl. на среде МС, содержащей 1 % агара, закладка адвентивных почек наблюдалась в присутствии 1,33 мкМ БАП [20].

В Голландии разработана методика клонального микроразмножения химерной *Y. elephantipes* Regel., путем индукции закладки придаточных почек. Показано, что интенсивность адвентивного побегообразования изолированных боковых побегов *Y. elephantipes* определяется целым рядом факторов, из которых важнейшим является присутствие БАП и его концентрация, содержание сахарозы и температура. За 12 недель от материнского побега индуцировалось развитие 7-8 адвентивных побегов [32].

Проростки *Y. valida*, полученные *in vitro* в культуре изолированных семян, также были размножены путем клонирования *in vitro* посредством активации латеральных почек на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) и 5 мкМ БАП [12]. При этом, был определен оптимальный баланс регуляторов роста. Было исследовано влияние различных комбинаций ИУК и БАП на процесс адвентивного побегообразования. При использовании исключительно ИУК, без добавления цитокинина, происходило развитие исключительно апикальной меристемы без признаков гипертрофии или каллусообразования. Наблюдалась положительная корреляция закладки латеральных побегов и концентрации БАП, однако статистически достоверная зависимость при совместном воздействии БАП и ИУК обнаружена не была. Максимальная закладка адвентивных побегов была отмечена при использовании 10 и 20 мкМ БАП в сочетании с

5 мкМ ИУК. Замена ИУК на 2,4-Д и НУК приводило к нарастанию каллуса. Таким образом, использование питательной среды, дополненной 10 или 20 мкМ БАП в сочетании с 5 мкМ ИУК, являлось более эффективным для адвентивного побегообразования в случае с *Y. valida* [12]. При этом закладка адвентивных побегов была отмечена на 10-й день культивирования и достигала максимального числа побегов на эксплант после 30-го дня культивирования. Использование высоких концентраций БАП (30 мкМ) вызывало гипертрофию и каллусогенез. В отсутствие регуляторов роста у изолированных микропобегов *Y. valida* всегда отмечался ризогенез, и применение ИУК не оказывало заметного влияния на активность ризогенеза. С другой стороны, присутствие БАП всегда вызывало его полное подавление [12].

С.Е. Бенц [15] была разработана система микроразмножения уникальных розово- и белоцветковых селекционных форм *Y. glauca*. Апикальные меристемы, взятые от взрослых растений, культивировались на питательной среде МС, дополненной различными комбинациями НУК (от 0,0 до 3,2 мкМ) и БАП (от 0,0 до 45 мкМ). При этом пролиферация адвентивных побегов также происходила при увеличении концентрации БАП [15].

Морфогенетический ответ на присутствие и концентрацию БАП и НУК был сходным для разных генотипов *Y. glauca*, а попытка замены БАП на N6-(2-изопентиниладенин) показала, что 2iP является неэффективным при индукции адвентивного побегообразования [15].

Таким образом, индукция адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов *Yucca sp.* с помощью БАП описана многими авторами: Bentz et al. [15] для *Y. glauca*; Pierik and Steegmans [32] для *Y. elephantipes*, Atta-Alla и Van Staden [13] для *Y. aloifolia*, Kaneda et al. [20] для *Y. schidigera*, Arce-Montoya [12] для *Y. valida*.

Ризогенез

Укоренение микропобегов *Yucca sp.*, как правило, наблюдается на безгормональных питательных средах [12, 15, 32], или средах, дополненных ИМК [13, 15, 32] или НУК [27]. ИУК, как правило, оказывается неэффективной [12].

Микропобеги *Y. glauca* успешно укоренялись на безгормональных питательных средах или средах, содержащих низкие концентрации β-индолил масляной кислоты (ИМК) [15]. Пролифериовавшие побеги *Y. aloifolia* укоренялись на питательной среде МС, содержавшей половинную концентрацию макро- и микро солей и дополненной 2,5–4,9 мкМ ИМК и 1% активированного угля [13]. Укоренение микропобегов *Y. elephantipes* происходило как на безгормональной питательной среде МС, так и на средах, дополненных 0,049–24,6 мкМ ИМК. Причем, оптимальный по эффективности и морфологии ризогенез отмечали на питательной среде, дополненной 4,9 мкМ ИМК [32]. Стабильный ризогенез отмечался в культуре изолированных микропобегов *Y. valida* в отсутствие регуляторов роста. При этом применение ИУК не оказывало заметного влияния на активность ризогенеза и морфологию корней, а присутствие БАП вызывало полное его подавление [12].

Согласно данным ряда авторов [13, 15, 32], во всех описанных случаях растения-регенеранты успешно адаптировались в почве.

Также в литературе описано получение культуры изолированных корней *Yucca sp.* Так, культура изолированных корней *Y. torreyi* (син. *Y. macrocarpa*) была получена из высечек корней проростков. Апексы корней *Y. torreyi* длиной 2,5 см культивировались в 125 мл колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл жидкой среды Вайта (20 г/л сахарозы, pH=5,7) [41, 42], или МС (1/4 концентрации минеральных солей, полная концентрация NH₄NO₃, 3 мг/л глицерина, 20 г/л сахарозы, pH=5,7). При этом рост корней зависел от условий культивирования, а кривые роста были идентичны на обеих средах [23]. Индукция культуры корней наблюдалась также в случае *Y. schidigera* Roetzl. при переносе неорганизованного каллуса, полученного на питательной среде МС, дополненной 4,52 мкМ 2,4-Д на среду МС, содержащую 16,11 мкМ НУК [27].

Каллусогенез

Впервые каллус юкки был получен в 1974 г. С. Стоксом на примере *Yucca glauca* [40]. При этом был разработан метод получения каллуса и клеточной суспензии из прорастающих семян *Y. glauca* на питательной среде МС, дополненной 0,53 мкМ 2,4-Д. Позже, в Институте биохимии растений АН ГрузССР получили каллус из эксплантов цветков *Y. gloriosa* на среде МС дополненной 2,6 – 5,3 мкМ 2,4-Д [29]. Каллус был получен из колеоптиля и высечек листа *Y. filifera* [33, 35]. Khanna S. и P. Purohit получили каллусную ткань из эксплантов листа на питательной среде МС, содержащей 5,3 мкМ 2,4-Д, при этом восьминедельный каллус имел ростовой индекс 1,7 [24].

Активный каллусогенез наблюдался при проращивании семян *Y. schidigera* Roetzl. на среде МС, содержащей 1 % агара в присутствии 1,36 мкМ 2,4-Д [20], а в случае *Y. valida*, на питательных средах МС дополненных 10-20 мкМ БАП в комбинации с 5 мкМ 2,4-Д или НУК [12].

В Грузии в течение многих лет велись работы по культивированию *Y. gloriosa* как потенциального промышленного источника стероидных гликозидов. Первичный каллус *Y. gloriosa* был получен от изолированных бутонов на питательной среде МС, дополненной 2,26 – 4,52 мкМ 2,4-Д. Успешное субкультивирование осуществлялось на питательной среде МС, дополненной 0,09226 – 0,226 мкМ 2,4-Д [3, 4, 9].

Каллусы некоторых видов *Yucca*, такие как *Y. filifera* [33] и *Y. schidigera* [20] продемонстрировали способность продуцировать стероидные гликозиды [34].

Информация относительно регенерации растений рода *Yucca* из каллуса в литературе пока отсутствует. Хотя С. Бенц отмечалась пролиферация побегов в культуре каллуса *Y. glauca* при увеличении концентрации БАП, в то время как в присутствии НУК и исключении БАП происходило угнетение побегообразования и пролиферация каллуса [15].

Материалы и методы

Объектами исследований служили *Yucca aloifolia* L. и *Y. torreyi* Shafer., растущие в коллекции Никитского ботанического сада.

Первичными эксплантами служили семена и изолированные зародыши, культивировавшиеся на безгормональных питательных средах Монье (М) [30] и МС [31].

Стерилизация семян производилась в две стадии: 1) предварительная поверхностная стерилизация плода 96%-ным этанолом и 2) стерилизация изолированных семян 70%-ным этанолом (1 мин) с последующей промывкой в дистиллированной воде. Семена высевались поверхностно на твердые питательные среды М и МС по 5-10 шт. в случае с *Y. torreyi* и 10-17 шт. в случае с *Y. aloifolia*.

Все дальнейшие манипуляции производились с ювенильными растениями, полученными *in vitro*.

В ходе исследований использовались модифицированные питательные среды М, МС и Quoirin, Leroivre (QL) [36] с полной и половинной концентрациями солей.

При получении каллуса в качестве первичных эксплантов использовали зиготические зародыши, высечки листьев и корней растений, выращенных в культурах изолированных зародышей и семян на безгормональных питательных средах (М, МС, QL).

В дальнейших опытах культивирование осуществлялось на агаризованных питательных средах QL и МС с полной и половинной концентраций макро- и микросолей, дополненных БАП (0,0; 0,44; 0,89; 1,78; 2,22; 4,4; 6,62; 8,90; 11,12; 13,3 и 24,42 мкМ), ИУК (0,228; 2,85; 5,71 мкМ), ИМК (0,098; 0,197; 0,49; 0,98; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ), НУК (0,107; 0,215; 0,43; 0,54; 1,07; 2,15; 2,69; 4,83; 5,37; 10,74 и 16,11 мкМ) и 2,4-Д (0,181; 0,45 и 18,1 мкМ) при 6%-ном содержании агара и постоянном значении pH=5,8, T=24°C и освещенности 1000-1200 лк.

Эффективность клонального микроразмножения оценивалась по формуле:

$$K = \frac{N - n}{n}$$

где: N – конечное число микропобегов; n – исходное количество микропобегов, K – эффективность микроразмножения

Частота регенерации (R) оценивалась в проценте эксплантов, образывавших адвентивные побеги.

Для укоренения микропобегов использовалась среда МС с половинной концентрацией макро- и микросолей, содержащая 25 мг/л мезоинозитола, 15000 мг сахарозы и удвоенную концентрацию по хелатному комплексу (55,6 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 74,6 мг/л Na_2EDTA) при рН=6,5.

Ауксины добавлялись в концентрации 1 мг/л в следующих соотношениях и концентрациях: 1) 5,71 мкМ ИУК; 2) 5,37 мкМ НУК; 3) 4,9 мкМ ИМК; 4) 9,8 мкМ ИМК; 5) 4,52 мкМ 2,4-Д; 6) 2,85 мкМ ИУК + 2,69 мкМ НУК; 7) 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК; 8) 2,69 мкМ НУК + 2,46 мкМ ИМК; 9) 5,14 мкМ ИУК + 0,45 мкМ 2,4-Д; 10) 4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д; 11) 4,43 мкМ ИМК + 0,45 мкМ 2,4-Д.

Контролем служила среда МС оригинального состава без регуляторов роста.

Результаты и обсуждение

Первичная асептическая культура *Yucca aloifolia* и *Y. torreyi* была получена через культуру изолированных семян и зиготических зародышей на питательных средах М и МС, не содержащих регуляторы роста (рис. 1). При этом процент взошедших семян в условиях *in vitro* составлял 89-95% для *Y. torreyi* и 100% для *Y. aloifolia*. Для культуры изолированных семян *Yucca* был характерен длительный период прорастания. Так, например, в случае с *Y. aloifolia*, прорастание первых семян наблюдалось на 9-й день культивирования и заканчивалось на 125-й день. Все дальнейшие исследования проводились на культурах изолированных зародышей, а также на каллусных культурах индуцированных из листовых и корневых эксплантов ювенильных растений, полученных *in vitro*.

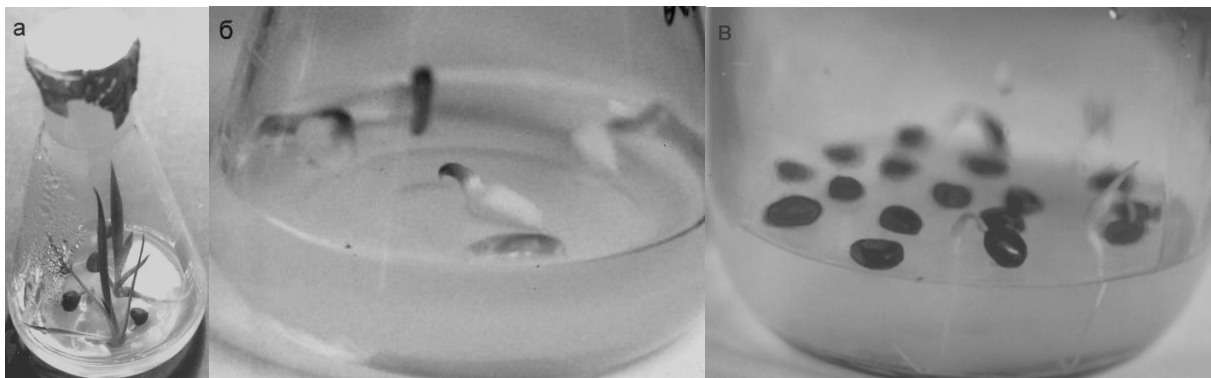


Рис. 1. Прорастание семян и изолированных зиготических зародышей *Y. torreyi* (а, б) и *Y. aloifolia* (в) на безгормональных питательных средах: а – Мурасиге и Скуга (1962); б – Мурасиге и Скуга (1962); в - на среде Монье (1968)

При культивировании изолированных зиготических зародышей *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* на безгормональных питательных средах М, МС и QL полного и половинного составов, всегда отмечалось развитие полноценных растений. Культивирование изолированных зиготических зародышей на средах МС и QL, содержащих БАП (0,44; 0,89; 1,78; 2,22; 4,4; 6,62; 8,9; 13,3 мкМ), приводило к развитию основного побега, а также к адвентивному побегообразованию при совместном использовании БАП и низких концентраций НУК (0,11-2,15 мкМ) и ИМК

(0,1-1,97 мкМ). При культивировании зародышей на средах с НУК (0,54; 1,07; 2,15; 2,69; 5,37; 10,74; 16,11 мкМ) или ИМК (0,49; 0,98; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ) в концентрациях равных или преобладающих над цитокининами, происходило развитие корней различной морфологии (рис. 2, а), подавление развития побега и нарастание каллуса, с последующей пролиферацией многочисленных корней (рис. 2, б). При этом, отмечено влияние концентрации питательной среды на морфогенез. Так на питательной среде $\frac{1}{2}$ QL, дополненной 0,89 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК, наблюдали ризогенез, сопровождавшийся полным подавлением развития побега (рис. 2, а). Использование среды QL с полной концентрацией макро- и микро-солей приводило к нарастанию каллуса с последующей пролиферацией многочисленных поверхностных корнеподобных структур (рис. 2, б).

Каллусогенез и органогенез

Проведенные исследования по индукции каллусогенеза, подтвердили правильность выбора рядом авторов [3, 4, 9, 12, 20, 24, 29, 33, 34, 35, 40, 41] 2,4-Д как лучшего регулятора роста для получения каллуса *Yucca* sp. В наших экспериментах активный каллусогенез, вне зависимости от видовой принадлежности и первичного экспланта, происходил на питательной среде МС, дополненной 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д. При этом было отмечено явное различие в способности первичных эксплантов к каллусогенезу (табл. 1). Пассирование каллуса на питательные среды для регенерации приводило к реализации морфогенеза через геммогенез (рис. 3, а, б, 4, б, в), ризогенез (рис. 4, б), гемморизогенез (рис. 4, б) и эмбриоидогенез (рис. 3, а, в).

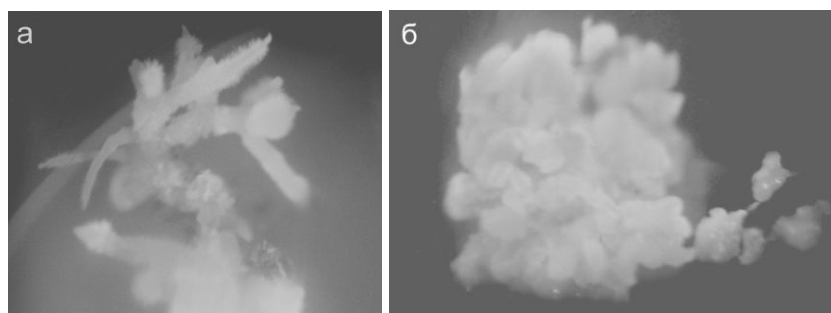


Рис. 2. Влияние на морфогенез изолированных зародышей *Yucca* питательной среды и преобладания концентраций ИМК.

а - ризогенез при культивировании на среде $\frac{1}{2}$ QL+0,89 мкМ БАП+1,97 мкМ ИМК;
б - каллусогенез с последующим формированием многочисленных корнеподобных структур на среде QL + 0,89 мкМ БАП+1,97 мкМ ИМК

Таблица 1

Влияние первичного экспланта на каллусогенез на примере *Y. torreyi* (питательная среда МС, дополненная 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д)

Первичный эксплант	Число эксплантов (шт.)	Каллусогенез (шт.)	Цвет каллуса	Плотность каллуса
зародыш	30	27	светло-лимонный	плотный
лист*	30	16	белый	средней плотности
корень	30	3	белый	средней плотности

* - высечки листьев брались из базальной зоны листа

Самым высоким морфогенетическим потенциалом обладал каллус, индуцированный из зиготических зародышей. Пассирование его с питательной среды МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д на среду QL + 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК вызывало активный морфогенез, реализуемый через геммо- (рис. 3, а, б) и эмбриоидогенез (рис. 3, а, в).

В наших экспериментах, реализация морфогенеза в культуре изолированных листовых эксплантов ювинильных растений *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* происходила только через

каллусогенез. Прямой морфогенез нами не отмечен. При этом, наиболее активный каллусогенез из высечек листа (из базальной зоны), так же, как и в случае с зиготическими зародышами, наблюдался на питательной среде МС, дополненной 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д.

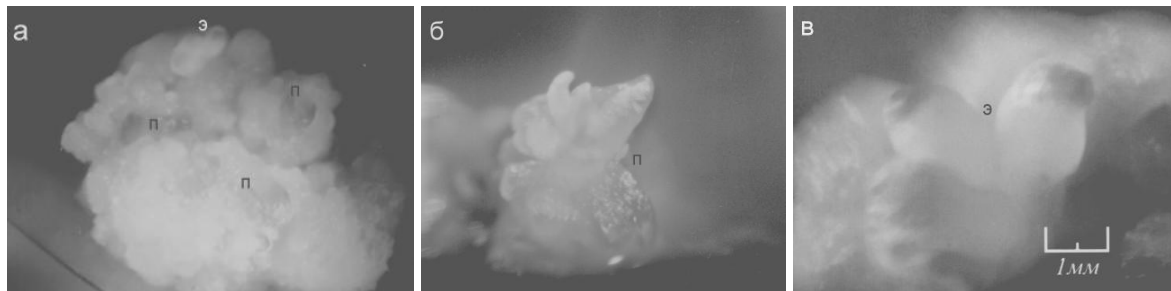


Рис. 3. Геммогенез (а, б) и эмбриоидогенез (а, в) в каллусной ткани зародышевого происхождения при перенесении с МС+2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д, на QL + 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК (п - почки; э-эмбрииды)

Каллус листового происхождения (рис. 4, а) был белый, рыхлый и не содержал проводящих элементов. При многократном пассировании на данной питательной среде был выделен каллус *Y. torreyi* без признаков морфогенеза, продолжавший активно нарастать даже после переноса на безгормональную среду МС и среды для регенерации. (рис. 4, а). Также отсутствовали проявления морфогенеза при помещении его на среды, вызывавшие морфогенез в каллусах зародышевого происхождения.

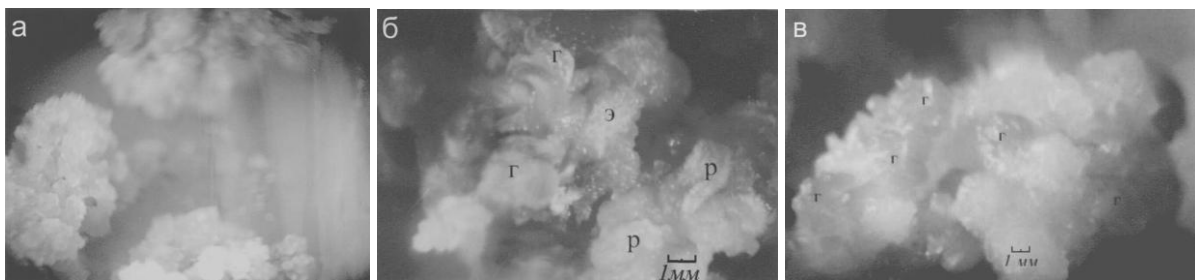


Рис. 4. Каллус *Y. torreyi* листового происхождения
а - нарастание каллуса на питательной среде МС+2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д; б - каллус листового происхождения на среде МС, дополненной 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК; в - геммогенез в каллусе листового происхождения на среде ½ QL, дополненной 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК (г - геммогенез; э - эмбриогенная зона; р - ризогенез)

Иногда, при культивировании листовых эксплантов *Y. torreyi* на среде МС, содержащей 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д, происходило образование каллуса, отличавшегося от вышеописанного по морфологии. Что, вероятно, обуславливается гетерогенностью индуцирующих (эмбриогенных) клеток тканей листа. Последний отличался способностью к морфогенезу. При пассировании его со среды МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д на среды для регенерации, наблюдалось образование корней различной морфологии и единичный геммогенез. Подобные процессы наблюдались и при перенесении каллуса на среду МС + 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК (рис. 4, б). Субкультивирование этого каллуса на среде QL полвинной концентрации и дополненной 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК индуцировало геммогенез (рис. 4, в). Дальнейшее развитие адвентивных почек отмечалось только при перенесении каллуса на безгормональные среды МС и QL, содержащие полные концентрации макро- и микросолей. Эмбриоидогенез в таком каллусе обнаружен не был.

Наряду с этим, слабое каллусообразование наблюдалось при культивировании высечек листа *Yucca torreyi* на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. К концу второго-третьего месяца культивирования на данной питательной среде или при перенесении

каллуса на безгормональную среду QL, наблюдали активный соматический эмбриоидогенез. Пассирование на другие безгормональные среды (МС, $\frac{1}{2}$ МС, $\frac{1}{2}$ QL) не вызывало формирование эмбриоидов. Культивирование образовавшихся эмбриоидов на безгормональных средах стимулировало развитие вплоть до торпедовидной стадии. Однако дальнейшее развитие эмбриоидов не отмечалось.

Помещение высечек корней (2-3 см) ювенильных растений *Y. torreyi* и *Y. aloifolia*, полученных в культуре изолированных зиготических зародышей и семян, на питательные среды, содержащие различные концентрации НУК (0,54; 2,15; 2,69; 5,37; 10,74; 16,11 мкМ) или ИМК (0,49; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ), способствовало непродолжительному росту апексов. Причем, как показали опыты, проведенные на высечках корней *Y. aloifolia*, рост в темноте был значительно более активным. По истечении 1-1,5 месяцев, как правило, рост прекращался, корни темнели и отмирали. Нарастания изолированных корней, регенерировавших из каллуса, также не происходило. Прямая регенерация из корневых эксплантов также не была отмечена ни на средах с НУК и ИМК, ни при введении БАП (0,44; 1,78; 2,22; 4,4; 8,9; 13,3 мкМ).

Помещение высечек корней *Y. torreyi* на среду МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д индуцировало нарастание каллуса только у 9 % эксплантов. Каллусогенез отличался низкой интенсивностью и происходил по всей длине экспланта. Спустя месяц образование каллуса постепенно прекращалось и не возобновлялось при пассировании на свежие питательные среды. Реализация гемморизогенеза или эмбриоидогенеза в каллусе корневого происхождения у исследованных нами видов не отмечена.

Таким образом, реализация морфогенетических потенций тканей и органов *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* зависела от целого ряда факторов. Основными из которых являлись: тип первичного экспланта, состав питательной среды, концентрация и соотношение регуляторов роста, продолжительность культивирования и количество пассажей.

Адвентивное побегообразование

В отличие от непрямого морфогенеза, прямое образование почек, минуя каллусогенез, обеспечивает генетическую однородность растений и позволяет избежать появления соматической изменчивости [5, 8]. Как было показано, в результате ранее проводившихся исследований [12, 15, 19, 20, 25, 26, 32], закладка адвентивных побегов в культуре изолированных побегов *Yucca sp.* чаще всего достигается при совместном использовании БАП и низкой концентрацией ауксина.

В результате подбора оптимальных условий культивирования, времени взятия первичного экспланта, подбора питательных сред (МС, QL) и соотношения фитогормонов (ИМК, НУК, БАП), нами были разработаны три способа индукции закладки придаточных почек в культуре *Y. torreyi*

При первом способе изолированные зародыши высаживали на среду QL, содержащую 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. На этой среде закладка адвентивных почек начиналась сразу после прорастания зародыша. Сначала происходило формирование основного побега, а затем у его основания закладывались адвентивные почки (1-6 шт.) без образования корней (рис. 5, а). При последующих пассажах аналогичную закладку адвентивных почек наблюдали и в основании множественных побегов. Для данного способа было характерно очень незначительное каллусообразование между множественными побегами в местах соприкосновения с питательной средой. Нарастание каллуса в основании побегов оказывало угнетающее влияние на адвентивное побегообразование, поэтому при последующих пассажах каллус удаляли.

При втором способе изолированные зародыши высаживали на среду QL, содержащую 8,9 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК. При этом происходило образование единичных микропобегов и активное нарастание каллуса в основании побегов. Ризогенез не наблюдали. Пассирование побегов на среду QL, дополненную 8,9 мкМ и 2,15 мкМ НУК, вызывало активную закладку адвентивных почек (от 2 до 14 шт.). Образование почек при условии предварительного субкультивирования на среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК, было более эффективным по сравнению с первым способом, а развивающиеся побеги (рис. 5, б)

отличались большей силой роста. Способность к активной закладке придаточных почек и высокая сила роста сохранялись и при дальнейшем пассировании на среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. После нескольких пассажей каллусообразование в основании побегов заметно снижалось.

Третий способ клонального микроразмножения *Y. torreyi* был разработан на основе среды, содержащей макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу [31]. При этом изолированные зародыши высаживали на среду МС, не содержащую фитогормоны. Через две недели после прорастания зародышей и образования растений с розеткой из двух-трех листьев, эпикотель переносили на среду МС, содержащую 0,54 мкМ НУК и 4,4 мкМ БАП. На данной среде происходила активная закладка адвентивных почек (2-10 шт.), в дальнейшем развивавшихся в полноценные побеги. (рис. 5, в). Для этого пути характерно отсутствие оводненности листьев, а также нарастание плотного каллуса в месте контакта побегов с питательной средой, не затрагивающего розетки листьев.



Рис. 5. Адвентивное побегообразование в культуре изолированных побегов *Y. torreyi* а - на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК; б - на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК, после субкультивирования на среде QL + 8,9 мкМ БАП + 1,97 мкМ ИМК; в - на среде Мурасиге и Скуга, содержащей 4,4 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК

При работе с *Yucca aloifolia*, из-за меньших размеров семян, извлечение зиготических зародышей было значительно затруднено. Поэтому, оптимальным первичным эксплантом являлись семена, полученные в условиях интродукции. Все дальнейшие исследования проводились на эпикотелях проростков, полученных *in vitro* на безгармональной питательной среде МС. Апробация питательных сред, разработанных для индукции адвентивного побегообразования в культуре эпикотеля *Y. torreyi*, показала их неэффективность применительно к *Y. aloifolia*. Поэтому была проведена работа по подбору питательных сред и условий культивирования применительно к данному объекту исследования.

За основу была взята питательная среда QL [36], хорошо зарекомендовавшая себя при работе с *Y. torreyi*. Эпикотили помещались на питательную среду QL, содержащую 2,15 мкМ НУК и различные концентрации БАП (2,22; 4,4; 6,62; 8,9; 24,42 мкМ). При этом рост изолированных эпикотилей наблюдался в диапазоне концентрации БАП от 2,22 до 24,42 мкМ, а адвентивное побегообразование – исключительно в диапазоне концентраций от 4,4 до 8,9 мкМ БАП. Причем, более интенсивным оно было на питательной среде, дополненной 6,62 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. При понижении концентрации НУК до 0,215 мкМ и добавлении БАП в концентрациях равных 2,22, 4,4 и 6,62 мкМ, адвентивное побегообразование было отмечено только на питательной среде, содержащей 6,62 мкМ БАП.

Понижение концентрации НУК с 0,215 до 0,107 мкМ, а также замена НУК на ИМК, ИУК или 2,4-Д в концентрациях эквивалентных 2 мг/л, показало, что более активное побегообразование происходило на питательной среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 0,098 мкМ ИМК. Питательная среда QL, содержащая 6,62 мкМ БАП и 0,107 мкМ НУК, оказалась не эффективной для адвентивного побегообразования. В дальнейшем, при повышении

концентрации НУК, ИМК, ИУК и 2,4-Д до концентрации эквивалентной 0,04 мг/л (0,215 мкМ НУК, 0,197 мкМ ИМК, 0,228 мкМ ИУК, 1,81 мкМ 2,4-Д) на фоне 6,62 мкМ БАП, адвентивное побегообразование отмечали только на питательных средах, содержащих НУК и ИМК. При этом коэффициент микроразмножения (К) был выше на питательной среде с НУК (К=0,8), чем на среде, содержащей ИМК (К = 0,73). Хотя, частота регенерации (R) в последнем случае была выше – 42,3 % против 29,3 % в варианте с НУК.

Также было исследовано влияние на адвентивное побегообразование разбавления питательной среды QL в два раза ($\frac{1}{2}$ QL). При этом, значение pH, концентрации сахарозы, мезоинозитола и регуляторов роста оставались неизменными. Адвентивное побегообразование происходило только на питательной среде $\frac{1}{2}$ QL дополненной 6,62 мкМ БАП и 0,197 мкМ ИМК (К = 0,4; R = 40%). Во всех других вариантах (6,62 мкМ БАП / 0,215 мкМ НУК, 6,62 мкМ БАП / 0,228 мкМ ИУК; 6,62 мкМ БАП / 0,181 мкМ 2,4-Д), адвентивное побегообразование не наблюдали.

При применении питательной среды QL, содержащей 6,62 мкМ БАП и 0,322 мкМ НУК, максимальное число адвентивных побегов *Y. aloifolia* достигало семи при (К = 0,83; R = 56,5 %) (рис. 6). При этом замена НУК на ИМК оказалась менее эффективной (К = 0,38; R = 40 %).



Рис. 6. Адвентивное побегообразование *Y. aloifolia* на питательной среде QL, дополненной 6,62 мкМ БАП и 0,322 мкМ НУК

Дальнейшая работа по оптимизации питательных сред показала, что в случае с *Y. aloifolia* наиболее эффективное адвентивное побегообразование происходило на питательных средах QL, дополненных 6,62 мкМ БАП и 0,43 мкМ НУК (max – 8 побегов; К = 0,95; R = 64,2 %) и 6,62 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК (max – 7 побегов; К = 1,04; R = 76 %). Дальнейшее увеличение концентрации НУК вызывало гипертрофию и каллусогенез.

Ризогенез

В случае с *Y. torreyi* для индукции ризогенеза было достаточно перенести микропобеги на безгормональные питательные среды, содержащие полный или половинный состав макро- и микросолей МС, или QL. Недостатком данного способа являлся длительный период (около месяца), проходящий от момента посадки до начала ризогенеза. В отдельных случаях ризогенез вообще не наблюдали. Наиболее эффективным оказалось использование для укоренения микропобегов *Y. torreyi* питательной среды МС, содержащей 1,07 мкМ НУК. В этом случае к началу второй недели с момента пассажа наблюдали образование корней нормальной морфологии.

Применение данной питательной среды для укоренения *Y. aloifolia* не способствовало стабильному ризогенезу. Поэтому была проведена работа по подбору оптимальной питательной среды для укоренения микропобегов данного вида. Во всех работах по клональному микроразмножению представителей рода *Yucca* успешное укоренение микропобегов достигалось на различных модификациях питательной среды МС [12, 13, 15,

27, 32]. Поэтому для укоренения *Y. aloifolia* именно эта питательная среда была выбрана нами за основу при подборе оптимального соотношения и концентрации регуляторов роста.

Обычно для укоренения микропобегов используют ИУК, ИМК и НУК. 2,4-Д стимулирует ризогенез только в очень низких концентрациях, часто не влияет на укоренение или оказывается токсичным для растения [10]. Хорошо зарекомендовали себя смеси ауксинов. Так, комбинация из ИУК и ИМК, как правило, оказывает больший эффект, чем использование этих стимуляторов по отдельности. При этом комбинация ИМК, НУК и 2,4-Д дает значительно более сильный ризогенный эффект, чем раздельное использование этих регуляторов роста [17].

В опытах с микропобегами *Y. aloifolia*, были испытаны как отдельные регуляторы роста, так и их комбинации (табл. 2). Контролем служила питательная среда МС без регуляторов роста. Ризогенез был отмечен на шестой день на питательных средах, содержащих 4,9 мкМ ИМК и 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК. На 30-й день ризогенез был отмечен на питательных средах: МС + 5,71 мкМ ИУК, МС + 4,9 мкМ ИМК, МС + 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК, МС + 4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д, а также на контрольной среде МС, не содержащей регуляторы роста (табл. 2).

Таблица 2

Укоренение микропобегов *Y. aloifolia* L. и их морфология под воздействием различных ауксинов (спустя 30 суток от начала культивирования)

Среда	Количество побегов			Нарастание каллуса в основании побега		Хлороз	
	укоренившихся, %	общее, шт.	укоренившихся, шт.	+/-	% побегов	+/-	к-во хлоротичных листьев, шт.
К (МС)	83,3	12	10*	-	0	+	4±2
5,71 мкМ ИУК	12,5	16	2	-	0	+	2±2
5,37 мкМ НУК	0	20	0	+	70	+	3,5±1,5
4,9 мкМ ИМК	70,5	17	12	-	0	+	1±1
4,52 мкМ 2,4-Д	0	17	0	+	100	+	2±2
2,85 мкМ ИУК + 2,69 мкМ НУК	0	21	0	+	100	+	2±2
2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК	36,4	22	8	-	0	+	1,5±1,5
2,69 мкМ НУК + 2,46 мкМ ИМК	0	21	0	+	42,9	+	1,5±0,5
5,14 мкМ ИУК + 0,45 мкМ 2,4-Д	0	18	0	+	38,9	+	2±2
4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д	12,5	16	2	+	33,3	+	2,5±2,5
4,43 мкМ ИМК + 0,45 мкМ 2,4-Д	0	18	0	+	100	+	1,5±1,5

* - недоразвитые корни

Наибольшее количество микропобегов (83,3%) укоренялось на контрольной среде МС, не содержащей регуляторы роста. Однако качество регенерантов было низким и растения погибали на этапе адаптации. Лучшей для укоренения микрочеренков *Y. aloifolia* оказалась среда МС, дополненная 4,9 мкМ ИМК. На данной питательной среде отмечали высокий процент укоренившихся микропобегов (70%) и высокое качество полученных растений. При увеличении концентрации ИМК с 4,9 мкМ до 9,8 мкМ вместо ризогенеза наблюдалось активное нарастание каллуса.

Существенное влияние на укоренение микропобегов также оказывала интенсивность освещения. Нормальный ризогенез наблюдали в диапазоне от 800-1200 лк. При увеличении

интенсивности освещения до 2000 лк происходило нарастание каллуса в основании микропобегов и полное подавление ризогенеза.

Выводы

Таким образом, высоким морфогенетическим потенциалом обладали изолированные зиготические зародыши, реализовывавшие все три пути морфогенеза, а низким – экспланты корней. Листовые экспланты также показали высокий морфогенетический потенциал, но реализация его происходила только через каллусогенез, при этом индукция образования морфогенных структур из листового каллуса происходила достаточно трудно, чем в каллусе, индуцированном из зиготических зародышей.

Полученные нами результаты подтвердили данные литературы о том, что решающим фактором при индукции каллусных культур растений рода *Yucca*, вне зависимости от первичного экспланта и видовой принадлежности, является присутствие в питательной среде 2,4-Д [3, 4, 9, 12, 20, 24, 29, 33-35, 40]. Так, у исследованных видов оптимальной питательной средой для индукции каллуса, вне зависимости от типа первичного экспланта оказалась питательная среда МС, дополненная 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д. Наряду с этим, высоким морфогенетическим потенциалом обладали каллусы, полученные от зиготических зародышей и листовых эксплантов, при работе с которым удалось индуцировать геммогенез, гемморизогенез и соматический эмбриогенез. Несмотря на это, получить растения рода *Yucca* путем регенерации из каллуса пока не удается. Анализ литературы также показал, что в отношении других исследованных видов рода *Yucca* подобные данные пока отсутствуют.

Размножение юкк путем индукции закладки придаточных побегов на данный момент представляется наиболее перспективным и реализовано на примере шести видов рода [12, 13, 15, 20-21, 22, 32]. В таблице 3 представлены сводные данные по результатам наших исследований и данных литературы, отображающие основные характеристики питательных сред для индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов *Yucca* sp.

Таблица 3

Питательные среды и соотношения регуляторов роста использовавшиеся для индукции адвентивного побегообразования (по данным литературы и результатам исследований)

Вид	Питательная среда	БАП	Ауксин	Источник информации
<i>Y. aloifolia</i>	МС	4,4-17,8 мкМ БАП 1,1-4,5 мкМ (TDZ)	1,1-2,7 мкМ НУК 0,5-1,1 мкМ НУК	[13]
	QL	6,62 мкМ	0,266-0,44 мкМ НУК	результаты исследований
<i>Y. elephantipes</i>	МС	4,4 мкМ	-	[32]
<i>Y. glauca</i>	МС	4,4-8,9 мкМ	3,2 мкМ НУК	[15]
<i>Y. torreyi</i>	QL	8,9 мкМ	2,15 мкМ НУК	результаты исследований
	МС	4,4 мкМ	0,54 мкМ НУК	результаты исследований
<i>Y. schidigera</i>	МС	1,33 мкМ	-	[20]
<i>Y. valida</i>	МС	5-20 мкМ	1 мкМ ИУК	[12]

Как видно из таблицы 3, основным фактором индукции адвентивного побегообразования в культуре *Yucca* sp., как правило, является присутствие в питательной среде БАП в концентрации от 1,33 до 20 мкМ на фоне низкой концентрации НУК (0,266-3,2 мкМ). Также имеются данные о возможности индукции адвентивного побегообразования у *Y. aloifolia* с применением TDZ в комбинации с НУК [13]. И, хотя, многие вопросы еще остаются открытыми, наработанный рядом исследователей экспериментальный материал и результаты

данных исследований позволяют составить общую схему размножения представителей рода *Yucca* (рис. 7), применимую при массовом размножении на основании реализации морфогенетической программы индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов.

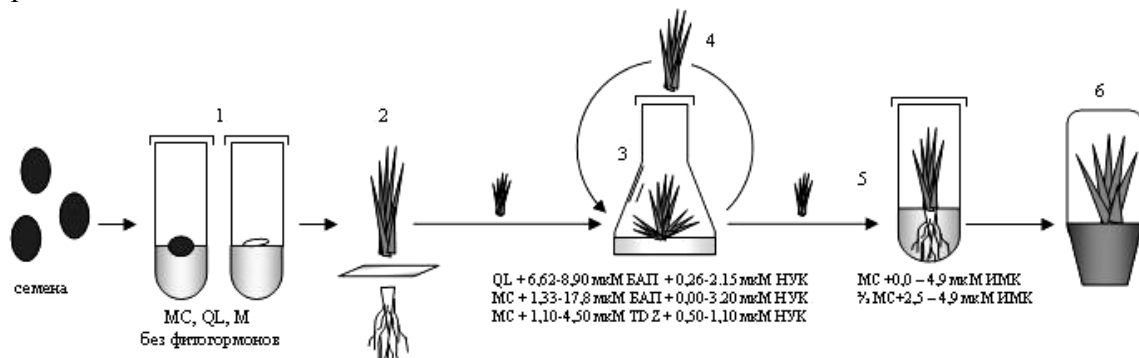


Рис. 7. Общая схема клонального микроразмножения представителей рода *Yucca* L. 1 – культура изолированных семян и зиготических зародышей; 2 – отделение эпикотеля; 3 – культивирование эпикотеля на питательных средах для адвентивного побегообразования; 4 – культивирование дочерних побегов на средах для массового клонального микроразмножения; 5 – укоренение микропобегов на средах, стимулирующих ризогенез; 6 – адаптация растений-регенерантов

Список литературы

1. А.с. №515498. СССР, кл. А 01 Н 1/02. Способ искусственного опыления растений *Yucca spp.* L. / Голубев В.Н., Максимов А.П., Волокитин Ю.С., Новикова В.М. (СССР). Опубл. 1973.
2. Анисимова А.И., Воинов В.Г., Клайда Ф.К., Чернова Н.М., Эггерс Е.В. Деревья и кустарники // Труды Гос. Никит. ботан. сада. – 1939. – Т. 22, Вып. 2. – С. 115.
3. Гогоберидзе М.К., Мамаладзе М.Н. Изучение влияния компонентов среды на рост ткани бутонов юкки славной // Сообщения АН ГССР. – 1980. – Т. 10, № 2. – С. 477.
4. Гогоберидзе М.К., Мамаладзе М.Н., Джаошвили М.Р., Каранова С.Л., Пхеидзе Т.А., Сулаквелидзе Ц.П. Характеристика суспензионной культуры клеток *Yucca gloriosa* L. // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, Вып. 2. – С. 378-384.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
6. Максимов А.П., Новикова В.М., Карпов П.А. Перспективы размножения юкки крупноплодной (*Yucca macrocarpa* Engelm.) в условиях интродукции // Ботанические сады – центры сохранения биологического разнообразия мировой флоры: Сессия Совета ботан. садов Украины, 13-16 июня, 1995, Ялта, Украина. Тез. докл. – Ялта. – 1995. – С. 136.
7. Максимов А.П., Мухортова Т.Г., Новикова В.М., Кузнецов В.Н. Биоэкологические характеристики и качество семян видов *Yucca* (Dill.) интродуцированных в Крым // Растительные ресурсы. – 1988. – Т. 24, № 2. – С. 230-237.
8. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
9. Месхи А.Б., Гогоберидзе М.К., Кацитадзе П.К. Культура тканей юкки славной – *Yucca gloriosa* // Изв. АН ГССР. Сер. биол. – 1978. – Т. 4, № 1. – С. 79.
10. Полевой В.В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.
11. Руссанов Ф.Н. Новые взаимосвязи в новых условиях жизни на примере юкки // Узбекистон Биология журнали / Узбекский биологический журнал. Изд-во Академии Наук Узбекской ССР. – 1959. – № 5. – С.54-57.

12. Arce-Montoya M., Rodríguez-Álvarez M., Hernández-González J.A., Robert. M.L. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 777-783.
13. Atta-Alla H., Van Staden J. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1997. – Vol. 48, N 3. – P. 209-212.
14. Baker H.G. Yuccas and Yucca Moths – a historical commentary. // Annals of Missouri Botanical Garden. – 1986. – Vol. 73, N 3. – P.556-564.
15. Bentz S.E., Parlman B.J., Talbott H.J., Ackerman W.L. Factors affecting *in vitro* propagation of *Yucca glauca*. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1988. –Vol. 14. – P. 111-120.
16. Davis D.R. 1967. A revision of the moths of subfamily Prodoxinae (Lepidoptera: Incurvariidae). U.S. Natl. Mus. Bull. N.255. Smithsonian Institution, Engelmann G. George Engelmann's Notes on the Pollination of *Yucca*. // Annals of Missouri Botanical Garden. – 1974. – Vol. 61. – P. 907.
17. Hartmann H.T. & D.E. Kester Plant propagation. Principles and practices. 4th edition. – Prentice-Hall Inc.: Englewood Cliffs, 1983. – 727 p.
18. Hostettmann K. and Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
19. Jones O.P., Hopgood M.E., O'Farrel D. Propagation *in vitro* of M 26 apple rootstocks. // J. of Horticultural Science. – 1977. – Vol. 52. – P. 235-238.
20. Kaneda N., Nakanishi H., Staba J.E. Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue culture // Phytochemistry. – 1987. – Vol. 26. – P. 1425-1429.
21. Karpov P.A. Clonal propagation of *Yucca aloifolia* L. // Acta Universitatis Latviensis. Biology. – 2004. – Vol. 676. – P.177-182.
22. Karpov P.A. Features of clonal micro propagation of Torrey Yucca. // Plant Physiol. Biochem. – 2000. – Vol. 38. – P. 19.
23. Kausch A.P. and Horner H.T. Differentiation of raphide crystal idioblasts in isolated root cultures of *Yucca torreyi* (Agavaceae) // Can. J. Bot. – 1984. –Vol. 62. – P. 1474-1484.
24. Khanna S.C., Purohit P.V. Studies of steroidal sapogenins from *Yucca alaeifolia* L. // Basic Life Sciences / Eds. Sen S.K., Giles K.L. – New York: Plenum Publ., 1983. – Vol. 22. – P. 65-69.
25. Kukuczanka K. and K.D. Kromer. Regeneracja *Yucca* sp. z rozmnożeń w kulturze *in vitro*. // Acta Univ. Wratisl.: Pr. Bot. – 1984. – N.30. – P.39-48.
26. Litz R.E. and R.A. Conover. Tissue culture propagation of some florage plants. // Proceedings of the Florida State Horticultural Society. – 1978. –Vol. 90. – P. 301-303.
27. MacCarthy J.J. and Staba E.J. Morphogenesis in *Yucca schidigera* Roezl. Root organ cultures // Ann. Botany. - 1985 – Vol. 56. – N 2. – P. 205-210.
28. McKelvey S.D. Yuccas of Southwestern United States. Part II. – Massachusetts. USA: Publ. Arnold Arboretum of Harvard Univ.: Jamaica Plants. Mass. – 1947. – P. 1-193.
29. Meskhi A.B., Gogoberidze M.K., Katsitadze K.P. Tissue culture of *Yucca gloriosa*. // Chem Abstr. – 1978. – Vol. 89. – P.358-359.
30. Monnier M. Comparison development of unripe embryos of *Capsella Bursa-pastoris* *in vitro* and *in situ*. // Bull. Soc. bot. France. – 1968. – Vol. 115. – P. 15-29.
31. Murashige T., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
32. Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M. Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel *in vitro* // Sci. Hort. – 1983. – Vol. 21. – P. 261-272.
33. Quintero A., Rosas V., Zamudio F., Capella S., Romo de Vivar A. Tissue culture of *Yucca filifera* cells. Identification of steroidal precursors // Tissue culture / Ed. Fujiwara A. – Japan: Maruzen, 1982. – P. 295-296.
34. Quintero A. *Yucca* // Hand book of plant cell culture. Ornamental Species / Eds. Ammirato P.V., Evans D.R., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. – New York: McGraw-Hill Publishing Co., 1983. – P. 783-799.

35. Quintero A., Zamudio F., Rasas V., Capella S., Romode Vivar A. Sarsasapogenin in *Yucca filifera* callus culture // Rev. Latinoam Quim. – 1987. – Vol. 18. – P. 24-28.
36. Quorin M. and P. Lepover. Etude de milieux adaptés aux cultures aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437.
37. Robert M.L., Herrera J.L., Contreras F., Scorer K.N. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequen) // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1987. – Vol. 8. – P. 37-48.
38. Romo de Vivar A. Productos naturales de la flora Mexicana. – Mexico: Editorial Limusa, 1985. – P. 194-202.
39. Rout G.R., Mohapatra A., Mohan Jain S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects // Biotechnology Advances. – 2006. – Vol. 24. – P. 531-560.
40. Stohs S.J., Sabatka J.J., Obrist J.J., Rosenberg H. Sapegenins of *Yucca glauca* tissue culture. // Lloydia. – 1974. – Vol. 37. – P. 504-505.
41. White P.R. A handbook of plant tissue culture. – New York: Jacques Cattell Press, 1943. – Vol. 4. – P. 791-794.
42. White P.R. The cultivation of plant and animal cells. 2nd ed. - New York: The Roland Press, 1963. – 239 p.

Tissue and organ culture of *Yucca* L.

Karpov P.A.

The optimal nutrient mediums and concentrations of growth regulators providing an effective cultivation of the isolated seeds and zygotic embryos of *Yucca torreyi* and *Y. aloifolia*, axillary microshoots regeneration, rooting, callus formation and realisation of different ways of morphogenesis have been determined. The literature review regarding the *in vitro* cultivation and micropropagation of yuccas have been provided. Based on literature data and results of individual experimental studies the general diagram of clonal micropropagation of representatives of the genus *Yucca* L. have been done.

К ВОПРОСУ О СОСТАВЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

MELILOTOIDES CRETACEA (M. VIEB.) SOJAK

А.Е. ПАЛИЙ, кандидат биологических наук;

В.Н. ЕЖОВ, доктор технических наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Одним из важнейших компонентов биологически активных веществ растительного происхождения, в том числе и *Melilotoides cretacea* (M. Vieb.) Sojak, являются вторичные метаболиты – тритерпеновые и фенольные соединения [15, 13]. Терпеновые и фенольные соединения принимают активное участие в регуляции роста и развития растений. В частности фенольные соединения играют важную роль в укреплении клеточных оболочек, а терпеновые как в стабилизации мембран растений [18, 23], так и разрушении мембран фитопатогенов [22].

Растительные соединения тритерпеновой и фенольной природы привлекают внимание исследователей, прежде всего, как основа эффективных фармакологических препаратов [8, 19]. Для тритерпеноидов, в частности, характерно противовоспалительное, аллелопатическое [25], антимикробное [21], инсектицидное [24], успокоительное, иммуностимулирующее, антиоксидантное [3, 7], а также противораковое [17] и гемолитическое [20] действие.

В то же время известен целый спектр биологического действия флавоноидов: Р-витаминное, сосудорасширяющее, спазмолитическое, гипотензивное, антиоксидантное и

антимикробное [14]. Установлено отрицательное влияние флавонолов на грампозитивные бактерии, флавонов и халконов – на стафилококк; антимикробная активность отмечалась у антоцианов, изофлавонов и катехинов [1].

Несмотря на большое число фармацевтических препаратов, поиск новых источников биологически активных веществ является актуальной задачей в связи с явлением привыкания. Ранее была показана биологическая активность экстрактов *M. cretacea*. Тем не менее, химическая природа биологически активных веществ этого растения не установлена.

Целью исследований являлось выделение и идентификация биологически активных веществ (тритерпеноидов и флавоноидов) из различных органов растения *Melilotoides cretacea* (M. Bieb.) Sojak.

Материалы и методы

Исследования проводили на листьях, стеблях, корнях и цветках растения *Melilotoides cretacea* (M. Bieb.) Sojak. Растительное сырье отбирали на окраинах с. Малое Садовое Бахчисарайского района и с. Морское Судакского района Крыма. Общая схема исследований приведена на рисунке 1.

Тритерпеновые гликозиды после упаривания спирта из суммарного экстракта обрабатывали бензолом, хлороформом и н-бутанолом. Из н-бутанольной фракции растворитель отгоняли под вакуумом, остаток очищали на колонке с силикагелем [4]. Анализ гликозидов выполняли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках "Silufol". Детектирование агликонов и тритерпеновых гликозидов осуществляли 25%-ным спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты. Олеаноловую кислоту идентифицировали хроматографически, путем сравнения с чистыми веществами известной структуры.

Флавоноиды экстрагировали из предварительно обезжиренного петролейным эфиром и хлороформом растительного сырья 70%-ным этанолом. Этанольный экстракт упаривали до водного остатка, из последнего флавоноиды экстрагировали н-бутанолом [2]. Количественное содержание фенольных соединений определяли с помощью реакции Фолина-Чиокальтео [10], идентификацию фенольных соединений проводили методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [11], двумерной бумажной хроматографии [12], дифференциальной УФ-спектроскопии [6] и качественными химическими реакциями.

Рострегулирующее действие суммарной фракции тритерпеноидов, а также водного экстракта корней определяли методом биотестов [16]. Тест-объектами служили редис (*Raphanus sativus* var. *radiculatus* L.) сорт Рубин, кресс-салат (*Lepidium sativum* L.) и салат (*Lactuca sativa* L.) сорт Кучерявец.

Антибактериальную активность водных и этанольных экстрактов, суммарных фракций тритерпеноидов, флавоноидов, а также индивидуальных флавоноидов оценивали по диаметрам зон угнетения роста тест-объектов: *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus citreus*, *Streptococcus anhaemoliticus*, *Nisseria meningitides*, *Nisseria flava*, *Salmonella kauffmani*, *Shigella flexneri* [5]. Бактериальные культуры выращивали на агаризованных питательных средах в чашках Петри по общепринятым в микробиологических исследованиях методам.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, вероятными считали изменения, где $P < 0,05$ [9]. Основные статистические расчеты проводили с использованием программ *Microsoft Excel* и *Statistica*.

Результаты и обсуждение

Динамика количественного и качественного содержания тритерпеноидов в течение вегетации M. cretacea

Анализ содержания веществ в водном и этанольном экстрактах корней, листьев, стеблей и цветков *M. cretacea* показал, что в экстрактах из корней присутствуют вещества тритерпеновой природы, а в этанольном экстракте надземных органов и цветков – тритерпеновые гликозиды, фенольные кислоты, флавоноиды. Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов составляло в корнях *M. cretacea* 25 мг/г сухого вещества, в надземных органах – 5 мг/г в фазе цветения.

Исследование содержания тритерпеноидов в этанольных экстрактах из листьев, стеблей и корней *M. cretacea* показало, что в период активного вегетативного роста наблюдалось низкое содержание агликонов и гликозидов; в дальнейшем их концентрация возрастала, достигая максимума во время цветения (июль), и на этапе окончания вегетации снова снижалась.



Рис. 1. Общая схема проведения исследований

По содержанию веществ тритерпеновой природы корни и наземная часть растения значительно отличались, при этом в листьях и стеблях преобладали полярные соединения. Тритерпеноиды корней *M. cretacea* представлены 16 соединениями, листки – 10, стебли – 12 и цветки – 7. В целом в течение вегетации в надземной части растения отмечалось высокое содержание тритерпеновых гликозидов (69,76% от суммарного содержания тритерпеноидов), а в корнях – агликонов (36,24%).

Хроматографически выявленные вещества тритерпеновой природы обозначены буквами латинского алфавита по мере увеличения их полярности (рис. 2).

Соединения тритерпеновой природы, которые имеют низкую полярность, были отнесены к группе агликонов (мелилотоидогенины А ... F); те, что имеют большую полярность и характерные реакции, отнесены к группе тритерпеновых гликозидов (мелилотоидозиды G ... S). В течение всей вегетации в корнях и надземной части

присутствовали мелилотоидогенины В и D, мелилотоидозиды Н, М, N. Для надземной массы и корней *M. cretacea* характерно максимальное количество мелилотоидогенина D и мелилотоидозида М (период цветения).

Тритерпеновые гликозиды корней *M. cretacea*

Методами ТСХ и ВЭЖХ определено шестнадцать веществ тритерпеновой природы в экстрактах корней *M. cretacea*. Суммарную фракцию тритерпеноидов разделили экстракцией растворителями разной полярности и колоночной хроматографией на фракции А ... F, G ... L,

М ... Р. По данным ТСХ-анализа, фракция А...F – смесь неполярных агликонов, близких по хроматографической подвижности, фракция G...L содержит монозиды и биозиды, имеющие среднюю полярность; фракция М...Р – более полярные триозиды и тетразиды.

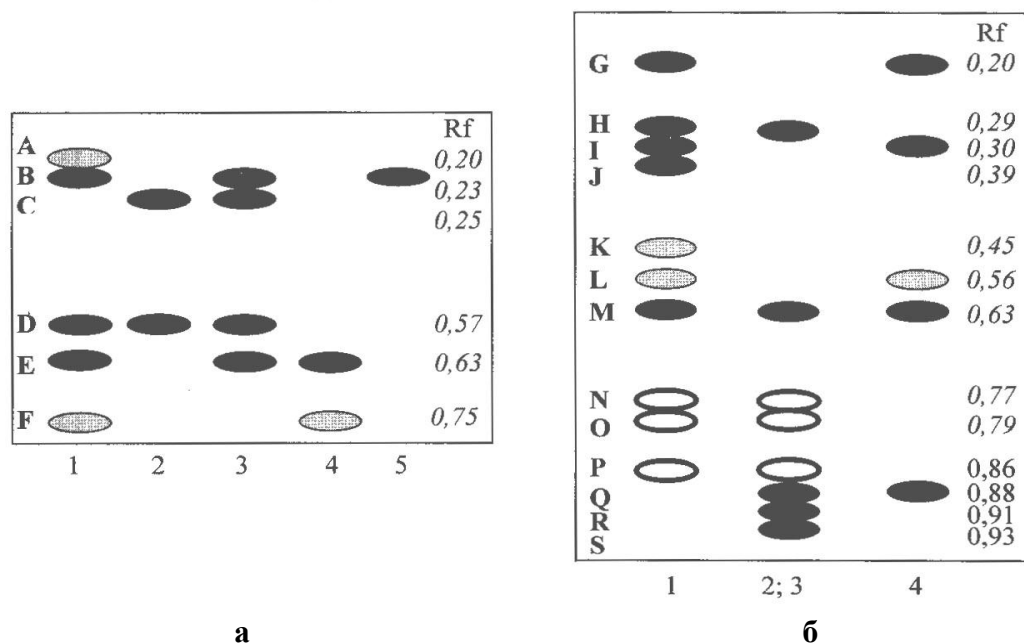


Рис. 2. Хроматографическое распределение тритерпеноидов *M. cretacea* в фазе цветения: 1) корни; 2) листья; 3) стебли; 4) цветки; 5) олеаноловая кислота. Системы растворителей: а – бензол-ацетон (4:1); б – хлороформ-метанол-вода (70:30:6). Условные обозначения цветов пятен:

■ – сине-фиолетовый, □ – синий, ▨ - красно-розовый

В полном кислотном гидролизате суммарной фракции тритерпеноидов присутствовали мелилотоидогенины А ... F и моносахариды – арабиноза, ксилоза, глюкоза, галактоза и рамноза. При хроматографическом сравнении свободных агликонов и агликонов, полученных в результате гидролиза с чистыми веществами известной структуры, установлено, что мелилотоидогенин В является олеаноловой кислотой.

Установлено, что в растениях *M. cretacea*, собранных одновременно в западном и восточном Крыму, качественное и количественное содержание тритерпеноидов совпадает. Поскольку в западном и восточном районах Крыма *M. cretacea* и виды *Melilotus albus* и *Melilotus officinalis* входят в состав одних и тех же растительных сообществ, а состав тритерпеновых гликозидов этих видов известен (Ходаков, Акимов, 1996), с целью уточнения возможных филогенетических отношений между ними на следующем этапе проведена оценка содержания тритерпенов *M. cretacea*, *M. albus* и *M. officinalis*. Выявлено, что корни *M. cretacea* отличаются большим разнообразием веществ тритерпеновой природы и в их состав входят более полярные соединения (мелилотоидозиды N...P). Олеаноловая кислота в *M. albus* и *M. officinalis* отсутствует. Соясапогенол В, присутствующий в корнях представителей рода *Melilotus*, в *M. cretacea* не обнаружен. Таким образом, в составе

тритерпеновых гликозидов *M. cretacea* и видов рода *Melilotus* сходства не выявлено, что свидетельствует об отдаленности этих таксонов.

Фенольные соединения *M. cretacea*

В период вегетативного роста в целом растении содержалось 5 мг/г сухого вещества фенольных соединений, в период цветения – 22 мг/г, в период плодоношения – 3 мг/г. В корнях выявлены следовые количества фенольных соединений. Максимальное количество этих веществ обнаружено в цветках (84 мг/г). Корни, стебли, листья и цветки *M. cretacea* существенным образом отличаются по количественному и качественному составу фенольных соединений (табл.1). Максимальное содержание этих соединений отмечено в цветках. Фенольные соединения стеблей и листьев в основном представлены фенолокислотами и незначительным количеством флавонолов. Среди фенольных соединений листьев и стеблей *M. cretacea* хроматографическим анализом и цветными реакциями идентифицированы хлорогеновая кислота и флавоноид рутин. В то же время в этанольном экстракте преобладали флавоноиды.

Таблица 1

Суммарное содержание фенольных соединений в органах *M. cretacea* на разных стадиях вегетации

Фенольные соединения, мг/г сухого вещества							
побегообразование (июнь)		цветение (июль)			созревание семян (август)		
листья и стебли	корни	листья и стебли	корни	цветки	листья и стебли	корни	семена
17,9	следы	26,0	10,6	84,5	10,6	следы	следы

Флавоноиды цветков *M. cretacea*

Хроматографическим распределением суммарной фракции флавоноидов цветков *M. cretacea* выявлено семь соединений, которые дают положительную цианидиновую реакцию. Выявленные вещества обозначены буквами латинского алфавита (по мере увеличения их полярности) как вещества А ... G (таблица 2). Данные анализа ВЭЖХ показали, что в спиртовом экстракте преобладали С и Е вещества, при этом А-вещество представлено в наименьшей концентрации.

Более детальное распределение суммарной фракции флавоноидов из цветков сделано методом двумерной хроматографии. При этом выявлено семь веществ флавоноидного характера, шесть из них по хроматографическому поведению были отнесены к гликозидам.

В полном кислотном гидролизате суммарной фракции флавоноидов цветков *M. cretacea* идентифицированы один агликон и два углевода – глюкоза и рамноза. Агликон предварительно по хроматографическому поведению и качественным реакциям охарактеризован как кверцетин.

С помощью реакций с диазотированной сульфаниловой кислотой, хлорокисью циркония, а также дифференциальной УФ-спектроскопии определены места присоединения углеводных радикалов и положение фенольных оксигрупп. Путем поэтапного гидролиза выявлена последовательность присоединения моносахаридов.

По изменениям в спектрах гликозидов и агликонов, обусловленным ионизирующими и комплексообразующими реактивами, установлено, что в веществах В, D, E содержатся оксигруппы в положениях 5, 7, 3', 4', а углеводный компонент находится в С₃-положении; в веществе С содержатся оксигруппы в положениях 5, 3, 3', 4', а углеводный компонент находится у С₇.

Таким образом, в составе флавоноидов цветков *M. cretacea* идентифицировано пять соединений (рис. 3).

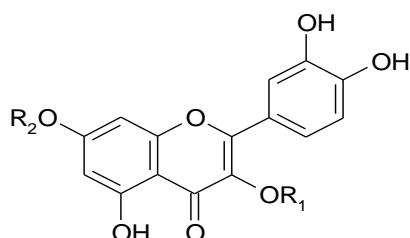
Вещество А: λ_{\max} (этанол) 368, 257 нм; время удерживания по данным ВЭЖХ Rt=109 мин. По результатам УФ-спектроскопии с комплексообразующими и ионизирующими добавками и сравнением с чистым веществом известной структуры идентифицировано как 3,5,7,3'-пентагидроксифлавонон (кверцетин). Данные кислотного гидролиза и УФ-спектроскопии веществ В – G дали возможность сделать вывод, что все они являются гликозидами – производными кверцетина.

Таблица 2

Некоторые физико-химические свойства флавоноидов цветков *M. cretacea*

Вещество	Значение R _f		УФ-спектр (в 95% этаноле), λ_{\max} , нм				Содержание, мг/г сухого вещества
	система I	система II	нейтральный раствор	+ацетат натрия	+хлорид алюминия	+ацетат натрия и борная кислота	
A	0,78	0,03	258, 270 пл, 370	257, 274, 329, 390	272, 304, 333, 458	261, 303, 388	0,73
B	0,71	0,04	256, 268 пл, 360, 300 пл; E _{256/360} = 0,95	272, 322, 372	276, 304, 333, 430	260, 300, 367	1,79
C	0,57	0,04	256, 268пл, 360, 300пл; E _{256/360} =0.95	286, 378, 428	259, 273, 399, 458	261, 289, 386	11,59
D	0,37	0,29	256, 268пл, 360, 300пл; E _{256/360} =1.14	271, 325, 393	275, 303, 433	262, 298, 387	6,30
E	0,34	0,27	256, 268пл, 359, 300пл; E _{256/360} = 1.13	271, 325, 393	275, 303, 433	262, 298, 387	11,69
F	0,12	0,42	256, 268пл, 360, 300пл; E _{256/360} 1.20	263, 297, 370, 422	275, 298, 335, 440	292, 380	2,10
G	0,09	0,56	256, 268пл; 361, 302пл; E _{256/360} 1.20	261, 295, 371, 423	275, 298, 335, 440	291, 380	3,84

I – система растворителей: н-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:5); II- система растворителей: 15% уксусная кислота



1. R₁ = H; R₂ = H
2. R₁ = Glc; R₂ = H
3. R₁ = H; R₂ = Glc
4. R₁ = Glc-Rha; R₂ = H
5. R₁ = Glc-Glc; R₂ = H

Рис. 3. Структуры флавоноидов цветков *M. cretacea*

1) вещество А; 2) вещество В; 3) вещество С; 4) вещество D; 5) вещество E

Вещество В: λ_{\max} (этанол) 360, 256 нм; время удерживания по данным ВЭЖХ Rt = 74 мин, в кислотном гидролизате присутствовали кверцетин и глюкоза. В результате сравнения с чистым веществом известной структуры идентифицировано как кверцетин-3-О-глюкозид (изокверцитрин).

Вещество С: λ_{\max} (этанол) 360, 258 нм; время удерживания по данным ВЭЖХ $R_t = 81$ мин, в кислотном гидролизате присутствовали кверцетин и рамноза. В результате сравнения с чистым веществом известной структуры идентифицировано как кверцетин-7-О-глюкозид (кверцетрин).

Вещество D: λ_{\max} (этанол) 360, 256 нм; время удерживания по данным ВЭЖХ $R_t = 58$ мин, в кислотном гидролизате присутствовали кверцетин, глюкоза и рамноза. В результате сравнения с чистым веществом известной структуры идентифицировано как кверцетин-3-О-глюкозил-рамнозид (рутин).

Вещество E: λ_{\max} (этанол) 358, 256 нм; время удерживания по данным ВЭЖХ $R_t = 62$ мин, в кислотном гидролизате присутствовали кверцетин и глюкоза. В результате сравнения с чистым веществом известной структуры идентифицировано кверцетин 3-О-глюкозил-глюкозид.

По результатам физико-химических исследований мы предполагаем, что вещества F и G гликозидированы по 3- и 7-атому углерода кверцетину.

Биологическая активность суммарных препаратов тритерпеновых гликозидов и флавоноидов M. cretacea

Следующая часть наших исследований была посвящена изучению потенциальной биологической активности препаратов тритерпеновых гликозидов и флавоноидов из *M. cretacea*. Установлено, что малополярная фракция тритерпеновых агликонов имела невысокую антимикробную активность; в связи с ее слабой растворимостью в воде, исследования проводили с суммарной фракцией гликозидов, имеющих среднюю и высокую полярность.

Исследование рострегулирующей активности суммарной фракции тритерпеноидов и водного экстракта из корней *M. cretacea* показало, что тритерпеновые гликозиды отрицательно влияют на прорастание семян и рост корней проростков редиса, кресс-салата и салата (табл. 3).

Таблица 3

Влияние суммарной фракции тритерпеновых гликозидов и водного экстракта из корней *M. cretacea* на прорастание семени редиса, кресс-салата и салата

Вариант опыта	Проросшие семена, % к контролю (дистиллированная вода)			
	редиса	кресс-салата	салата - 48 ч	салата - 72 ч
суммарная фракция тритерпеноидов 0,5%	65,83	83,04	62,60	75,14
суммарная фракция тритерпеноидов 1,0%	74,48	88,77	67,21	79,93
суммарная фракция тритерпеноидов 2,0%	88,05	62,64	67,47	77,94
водный экстракт корней 0,5 см ³	84,79	83,37	54,61	75,79
водный экстракт корней 1,0 см ³	85,27	81,63	57,78	82,37
водный экстракт корней 2,0 см ³	89,07	92,60	65,50	82,87

Процент проросших семян был неизменным в течение всего эксперимента в опытах с редисом и кресс-салатом. Другая картина наблюдалась при изучении влияния суммарной фракции тритерпеновых гликозидов на прорастание семян салата. Во всех вариантах опыта прорастание семян начиналось через 48 часов. При этом в контроле процент проросших семян превышал 70%, а в вариантах, обработанных веществами из суммарной фракции тритерпеноидов, был почти в два раза меньше. Через 72 часа у обработанных семян количество проросших семян увеличилось.

Процент угнетения роста корней проростков зависит как от концентрации тритерпенов, так и от продолжительности их действия. Например, для кресс-салата ростиингирующий эффект тритерпеноидов к окончанию опыта уменьшался, тогда как для редиса и салата – увеличивался.

При обработке семян тест-объектов водным экстрактом корней *M. cretacea* выявлено его отрицательное влияние на прорастание семени редиса, салата и кресс-салата, но в меньшей мере по сравнению с растворами суммарной фракции тритерпеноидов (табл. 4)

Для редиса и кресс-салата четкой зависимости прорастания семян от концентрации водного экстракта из корней не выявлено, в течение всего периода исследования процент проросших семян не изменялся. В опытах с салатом процент прорастания семян изменялся на протяжении трех суток. Не выявлено четкой зависимости прорастания семян и роста корней проростков от концентрации препарата.

Таблица 4

Влияние суммарной фракции тритерпеновых гликозидов и водных экстрактов из корней *M. cretacea* на рост корней проростков салата, кресс-салата и редиса

Вариант опыта	Длина корня, мм					
	салата		кресс-салата		редиса	
	48 ч	72 ч	48 ч	72 ч	48 ч	72 ч
контроль (дистиллированная вода)	2,3±0,9	9,7±1,4	8,2±1,0	23,4±3,1	3,9±0,8	21,5±1,7
суммарная фракция тритерпеноидов 0,5%	1,8±0,5	3,5±0,8	3,5±0,9	14,0±2,3	1,7±0,5	8,2±1,3
суммарная фракция тритерпеноидов 1,0%	1,2±0,4	2,3±0,5	2,7±0,3	7,1±0,8	1,7±0,6	5,3±1,3
суммарная фракция тритерпеноидов 2,0%	1,3±0,3	2,1±0,2	1,9±0,4	4,1±1,3	1,4±0,4	3,7±1,6
водный экстракт корней 0,5 см ³	1,3±0,2	2,4±0,4	4,6±1,2	18,2±1,4	2,0±0,4	9,2±1,9
водный экстракт корней 1,0 см ³	1,0±0,3	2,1±0,4	1,9±0,4	8,4±0,9	1,7±0,5	5,8±1,3
водный экстракт корней 2,0 см ³	1,3±0,3	1,8±0,4	2,0±0,3	9,0±0,7	1,3±0,3	4,5±0,8

Таким образом, тритерпеновые гликозиды проявляли значительную рострегулирующую активность на прорастание семени и рост корней проростков исследованных растений.

В широком диапазоне концентраций выявлено отрицательное влияние экстрактов из разных органов *M. cretacea* на культуры бактерий *S. albus*, *S. citreus*, *S. anhaemoliticus*, *N. meningitides*, *N. flava*, *S. kauffmani*, *S. flexneri* (рис. 4).

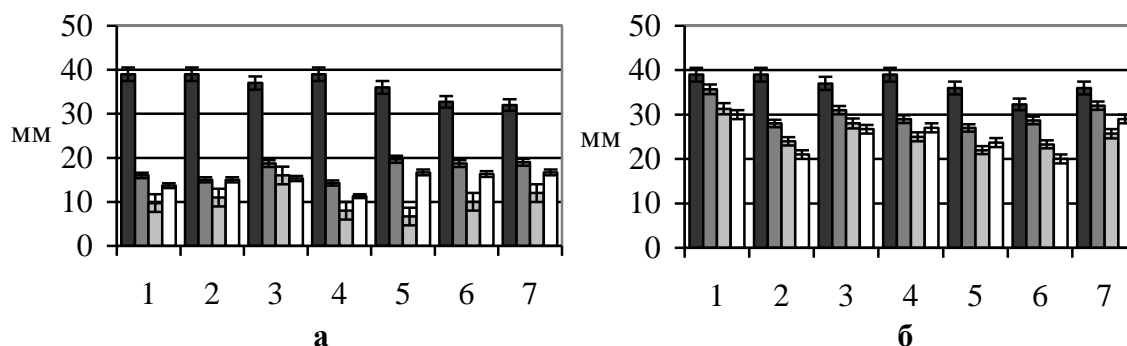


Рис. 4. Диаметр (мм) зон угнетения роста бактериальных культур: а) водными, б) спиртовыми экстрактами разных органов *M. cretacea*

1. *S. albus*, 2. *S. citreus*, 3. *S. anhaemoliticus*, 4. *N. meningitides*, 5. *N. flava*,
6. *S. kauffmani*, 7. *S. flexneri*

■ -ампициллин ■ -корни, ■ -листья и стебли, □ -цветки

Биологическая активность (в эквивалентных концентрациях) спиртовых экстрактов была в два раза выше, чем водных. Наибольшее антимикробное действие на бактериальные культуры выявлено для экстракта из корней растения.

Исследование антимикробного действия суммарной фракции тритерпеновых гликозидов в концентрации $1,0 \text{ мг/см}^3$ выявило высокую ингибиторную активность препарата как для грампозитивных, так и для грамотрицательных бактерий (рис. 5).

Наибольшее угнетение роста колоний бактерий экстрактом тритерпеноидов отмечено у *S. albus* и *S. flexneri*. Значительно более слабым было действие в вариантах с *N. flava*. В концентрациях $0,5 \text{ мг/см}^3$ бактерицидный эффект был в два раза меньшим. В более низких концентрациях действие препарата оказалось незначительным или отсутствовало.

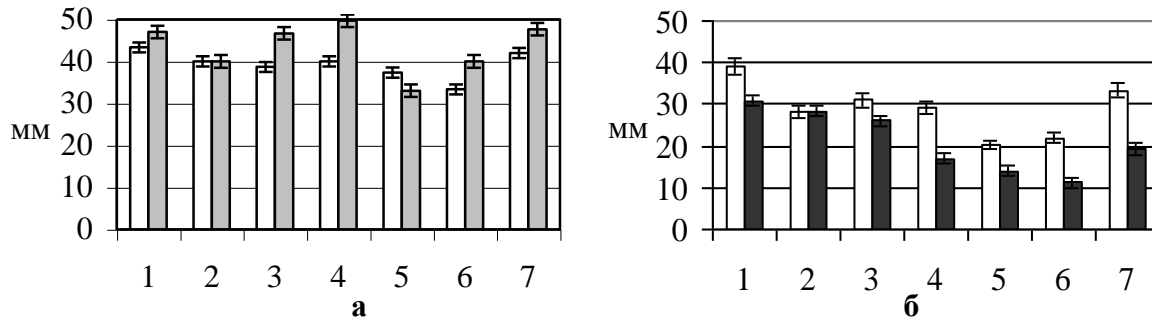


Рис. 5. Диаметр (мм) зон угнетения роста бактериальных культур: а) суммарной фракцией тритерпеноидов корней *M. cretacea* в) суммарной фракцией флавоноидов цветков *M. cretacea* в концентрации $1,0 \text{ мг/см}^3$.

1. *S. albus*, 2. *S. citreus*, 3. *S. anhaemoliticus*, 4. *N. meningitides*, 5. *N. flava*,
6. *S. kauffmani*, 7. *S. flexneri*

■ – ампициллин, □ – суммарная фракция тритерпеноидов,
■ – суммарная фракция флавоноидов

Суммарная фракция флавоноидов *M. cretacea* в концентрации $1,0 \text{ мг/см}^3$ проявила наибольшее угнетающее действие на рост бактериальных культур. Самая высокая эффективность препарата отмечена для культур *S. albus* (78,4% относительно ампициллина), *S. citreus* и *S. anhaemoliticus*. В то же время торможение роста *S. kauffmani* составило 52,3%.

Антибактериальная активность кверцетина и его гликозидов из цветков *M. cretacea* была на 30% ниже по сравнению с суммарной фракцией флавоноидов (в адекватных концентрациях). Наибольшее угнетение роста бактериальных культур обуславливали рутин и кверцетин-3-О-глюкозил-глюкозид. Максимальная антимикробная активность относительно *S. albus* и *S. citreus* (соответственно 69 и 67% относительно ампициллина). Наименее активным был кверцетин (35,1% относительно ампициллина).

Таким образом, для выделенных нами препаратов установлено рострегулирующее действие на прорастание семени и рост корней проростков редиса, кресс-салата и салата. Для этих веществ также установлена антимикробная активность относительно патогенных бактерий *S. albus*, *S. citreus*, *S. anhaemoliticus*, *N. meningitides*, *N. flava*, *S. kauffmani*, *S. flexneri*.

Заключение

Исследовано количественное и качественное содержание тритерпеноидов и флавоноидов разных органов растения *Melilotoides cretacea* на протяжении вегетации. Максимальное накопление тритерпеновых гликозидов выявлено в период цветения в корнях, а флавоноидов в цветках растения. Из семи выделенных из растения флавоноидов идентифицировано пять: кверцетин, кверцетин-3-О-глюкозил, кверцетин-7-О-глюкозил, кверцетин-3-О-глюкозил-рамнозид, кверцетин-3-О-глюкозил-глюкозид. Кверцетин-7-О-глюкозил и кверцетин-3-О-глюкозил-глюкозид присутствуют в растениях в высоких концентрациях. Среди

фенольных соединений идентифицированы фенольные кислоты и рутин. Из выявленных 19 соединений тритерпеновой природы идентифицирована олеаноловая кислота.

Показана рострегулирующая активность тритерпеноидов *M. cretacea* на модельных объектах (салат, кресс-салат и редис).

Установлено антибактериальное действие тритерпеновых гликозидов относительно грампозитивных (*Staphylococcus albus*, *S. citreus*, *Streptococcus anhaemoliticus*) и грамотригативных (*Nisseria meningitides*, *N. flava*, *Salmonella kauffmani*, *Shigella flexneri*) бактерий. Антимикробное действие спиртовых экстрактов из корней обусловлено наличием тритерпеновых соединений, а для спиртовой вытяжки из цветков как тритерпеноидов, так и флавоноидов. Проведенные исследования позволяют отнести растение *M. cretacea* к перспективным источникам естественных фармакологических препаратов.

Список литературы

1. Бандюкова В.А., Череватый В.С., Озимина И.И. Антибактериальная активность флавоноидов некоторых видов цветковых растений // Растит. ресурсы. – 1987. – Т. 23, Вып. 4. – С.607-612.
2. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. – М.: Высшая школа, 1983. – 218 с.
3. Деканосидзе Г.Е., Чирва В.Я., Сергиенко Т.В. Биологическая роль, распространение и химическое строение тритерпеновых гликозидов. – Тбилиси: Мецниереба, 1984. – 349 с.
4. Исследование тритерпеновых гликозидов (установление строения и синтез) / Г.Е. Деканосидзе, В.Я. Чирва, Т.В. Сергиенко, Н.И. Уварова. – Тбилиси: Мецниереба, 1982. – 152с.
5. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
6. Литвиненко В.И., Попова Т.П. Аммосов А.С. Новые возможности методов УФ-спектроскопии в исследовании природных флавоноидов // Тез. докл. семинара по физиологии и биохимии фенольных соединений растений. – Тарту, 1972. – С. 5-7.
7. Малыгина В.Ю., Гришконец В.И., Криворутченко Ю.Л. Влияние таурозидов Sx1 на летальную гриппозную инфекцию у мышей // Таврический Медико-Биологический Вестник. – 2003. – Т.6, № 1. – С. 47-50.
8. Машковский М.Д. Основные лекарственные средства: В двух книгах. – Харьков: Фолио, 1999. – Кн.1. – 560 с.
9. Менчер Э.М., Земшман А.Я. Основы планирования эксперимента с элементами математической статистики в исследованиях по виноградарству. – Кишинев: Штиинца, 1986. – 238 с.
10. Методы технохимического контроля в виноделии. / Под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида, 2002. – 260 с.
11. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М.: Химия, 1986. – 288 с.
12. Теслов Л.С. Сравнительное изучение флавоноидного состава видов рода *Campanula* L. ряда *Rapunculoides* Charadze из секции *Campanula* // Растит. ресурсы. – 2000. – Т. 36, Вып. 1. – С. 4-16.
13. Фадеев Ю.М., Голубев В.Н. Распределение тритерпеновых гликозидов в растениях семейства *Fabaceae* флоры Крыма // Биохимия плодовых и декоративных культур. Труды Никит. ботан. сада. – 1985. – Т. 95. – С. 54-61.
14. Хаджай Я.И. Фармакологическое действие и клиническое применение флавоноидов // Тезисы докладов 2-го Всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. – Алма-Ата: Наука, 1970. – С. 137-138.
15. Щербановский Л.Р., Нилов Г.И. О влиянии некоторых сапонинов на спиртовое брожение // Прикладная биохимия и микробиология. – 1967. – Т. 12, № 6. – С. 667-673.

16. Экспериментальная аллелопатия / А.М. Гродзинский, Э.А. Головкин, С.А. Горобец и др. – К.: Наукова думка, 1987. – 236 с.
17. Behboudi S., Morein B., Villacres-Eriksson M. Quillaja saponin formulations that stimulate proinflammatory cytokins elicit a potent acquired cell-mediated immunity. *Scandinavian // J. of Immunology*. – 1999. – № 50. – P. 371-377.
18. Goad L. Inhibitor of phytosterol biosynthesis and the consequences for plant growth. / *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. – Oxford: Clarendon Press, 1991. – P. 209–229.
19. Hostettmann K., Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
20. Oh S., Kinjo J., Shii Y., Ikeda T., Nohara T., Ahn K., Kim J., Lee H. Effects of triterpenoids from *Pueraria lobata* on immunohemolysis: β -D-glucuronic acid plays an active role in anticomplementary activity *in vitro* // *Planta Medica*. – 2000. – № 66. – P.506-510.
21. Osbourn A. Saponins in cereals // *Phytochemistry*. – 2003. – № 62. – P. 1-4.
22. Osbourne A.E., Wubben P.J., Melton R. E., Carter J.P., Daniels M.J. Saponins and plant defense. / *Phytochemical signals and plant-microbe interactions*. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 1–16.
23. Rohmer, M. The hopanoids. / *Surface structures of microorganisms and their interaction with the mammalian*. – Weinheim: Verlag Chemie, 1988. – P. 227-242.
24. Tava A., Odoardi M. Saponins from *Medicago* spp.: chemical characterization and biological activity against insects // *Advances in experimental medicine and biology*. – 1996. – № 405. – P.97-109.
25. Waller G.R., Jurzysta M., Thorne R.L.Z. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat // *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. – 1993. – 34. – P.1-11.

To the question about composition and biological activity of several secondary metabolites of *Melilotoides cretacea* (M. Bieb.) Sojak.

Paliy A.E., Yezhov B.N.

The biological active substances of *Melilotoides cretacea* (M. Bieb.) Sojak was investigated. It was determined that triterpene glycosides are present in all parts of plant. The most amount of triterpenes in *M. cretacea* is accumulated in the roots of plant during the period of flowering. It was discovered exposed 19 substances of triterpene nature in *M. cretacea*. Among them oleanolic acid was identified. Phenol acids and rutin were found in the stems and leaves, and flavonoids were found in the flowers. Among seven flavonoids which was extracted from the plant. Five of them were identified: quercetin, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-7-O-glucoside, quercetin-3-O-glucosyl-rhamnoside (rutin), quercetin-3-O-glucosyl-glucoside.

It was shown that triterpene compounds of *M. cretacea* have different kind of biological activity: antibacterial activity to the Gram-positive and Gram-negative bacteria and growth inhibitory activity (have negative influence on seeds germination and germs roots growth of the test-objects).

We concluded that *M. cretacea* is a perspective source of quercetin and glycosides of quercetin and triterpenes with high biological activity.

МОРФОГЕНЕЗ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ МЯТЫ В КУЛЬТУРЕ ЛИСТОВЫХ И СТЕБЛЕВЫХ ЭКСПЛАНТОВ *IN VITRO*

А. М. БУГАРА¹, доктор биологических наук;

И. А. БУГАРА², кандидат биологических наук

¹Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского,

²Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН

Мята – эфиромасличное и лекарственное растение с широким спектром практического использования. Сухой лист и эфирное масло мяты издавна используются для изготовления лекарственных средств, производства парфюмерно-косметических изделий, а также в качестве натуральных ароматизаторов. В последние годы в Украине созданы сорта мяты, характеризующиеся высоким сбором эфирного масла, повышенной урожайностью сухого листа, зимостойкостью и засухоустойчивостью, устойчивостью к ржавчине, с различным направлением биосинтеза эфирного масла: Симферопольская 200, Заграва, Украинска перечная, Двухукосная, Прилукская карвонная, Удайская, Удайчанка, Имла и другие [2].

В настоящее время для размножения мяты используются исключительно традиционные методы – корневищами и рассадой. Однако для ускоренного внедрения новых сортов в производство, а также для быстрого размножения уникальных селекционных генотипов уже недостаточно использования только традиционных методов. Необходима разработка эффективных технологий размножения и производства высококачественного посадочного материала на принципиально новой методической основе. Создание таких технологий базируется на использовании комплекса методов культуры изолированных тканей и органов, а также решении фундаментальных вопросов регуляции морфогенеза *in vitro* в зависимости от генотипа, типа экспланта, состава питательной среды и условий культивирования.

На сегодняшний день накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о возможности клонального микроразмножения растений, как на основе культуры изолированных меристем, так и при использовании в качестве эксплантов других тканей и органов [4-6, 11, 18, 23]. Подавляющее большинство работ по клональному микроразмножению видов и сортов мяты базируется на использовании культуры изолированных меристем или вегетативных почек [1, 8, 22]. Особенности такого подхода для клонального микроразмножения ряда современных сортов мяты показаны нами ранее [3]. Однако возможность клонального микроразмножения мяты на основе культуры изолированных листовых и стеблевых эксплантов продемонстрирована пока для ограниченного числа видов рода *Mentha* [20]. Имеющиеся сорта мяты отечественной селекции не привлекались для подобных исследований. В этой связи целью настоящей работы являлось изучение некоторых особенностей морфогенеза в культуре листовых и стеблевых эксплантов мяты в связи с разработкой приемов клонального микроразмножения перспективных сортов, созданных на основе межвидовой гибридизации и экспериментальной полиплоидии.

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований служили сорта мяты Симферопольская 200 (*M. canadensis* L. К 59 (4n) x *M. aquatica* L. К 6), Заграва (*M. canadensis* К 59 (4n) x *M. longifolia* L. N 6), Украинская перечная (*M. piperita* A₂ (4n) x *M. spicata* 2.8.14), Двухукосная (*M. canadensis* К 60 (4n) x *M. spicata* 2.8.14) селекции Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН, а также сорт Прилукская 6 (получен методом отбора в семенном потомстве аллополиплоидной формы *M. piperita*).

Растения выращивали в условиях закрытого грунта, в качестве инициальных эксплантов использовали молодые листья и сегменты стебля (без узлов) длиной 0,7-1,0 см. Поверхностную стерилизацию растительного материала проводили 50% раствором препарата "Брадофен" с последующей промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Молодые листья и стеблевые сегменты культивировали на жидкой и агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга [17], дополненной 10 мг/л БАП (6-бензиламинопурин) и 0,5 мг/л ИУК (индолилуксусная кислота). При использовании жидкой питательной среды экспланты помещали на мостики из фильтровальной бумаги. На агаризованной питательной среде экспланты культивировали поверхностно. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2 x 20 см с 10 мл питательной среды. Экспланты культивировали в условиях термостатированного помещения при температуре 23-25°C, относительной влажности воздуха 60-70%, освещенности 3-4 тыс. люкс с фотопериодом 16 часов. В процессе культивирования проводили визуальный анализ морфогенеза и регенерации растений, а также подсчитывали количество микрорастений, индуцированных с одного экспланта (коэффициент размножения). Для адаптации полученных растений-регенерантов к условиям *in vivo* их переносили в субстрат, состоящий из торфа и керамзита (1:1). В первые две недели адаптации растения содержали в условиях повышенной влажности, а затем переводили на обычный режим выращивания в закрытом грунте.

Для цитологических исследований растительный материал фиксировали по Карнуа, готовили временные препараты и окрашивали метиленовым синим по общепринятой методике [7]. Цитологический анализ и фотографирование препаратов проводили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ с фотонасадкой МФНЭ-1.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили на персональном компьютере с использованием прикладного программного обеспечения Statistika 5.1 и Microsoft Office XP для Microsoft Windows. Результаты представляли в виде графиков с доверительными интервалами при 5%-ном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

При эксплантации на питательную среду молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 первым видимым признаком проявления морфогенетических реакций являлась дифференциация вегетативных адвентивных почек непосредственно из клеток экспланта (рис. 1, а, б). В дальнейшем наблюдалась регенерация микропобегов, а затем корневой системы. Асинхронность процесса приводила к тому, что на одном листовом экспланте обнаруживалось одновременно как заложение адвентивных почек, так и развитие микропобегов и ризогенез. Цитологические исследования позволили установить, что при культивировании молодых листьев дифференциация вегетативных почек наблюдалась преимущественно из субэпидермальных клеток базальной части листа (рис. 1, в, г).

Морфогенез и регенерация растений в культуре стеблевых сегментов имели некоторые особенности. В отличие от культуры листовых эксплантов, в данном случае сначала наблюдалось каллусообразование, которое было приурочено к поверхности среза и происходило с обоих концов экспланта. После нарастания определенной небольшой массы каллуса в нем наблюдалась дифференциация вегетативных почек с последующей регенерацией растений (рис. 2, а, б). Заложение почек, развитие микропобегов и корневой системы также проходило асинхронно, в результате чего на одном каллусе можно было наблюдать как развившиеся укорененные микропобеги, так и заложившиеся вегетативные почки. Цитологический анализ препаратов первичного каллуса из стеблевых сегментов выявил присутствие в нем клеток меристематического и паренхимного типов. При этом дифференциация вегетативных почек наблюдалась преимущественно в локальных скоплениях клеток меристематического типа (рис. 2, в, г).

С точки зрения клонального микроразмножения особый интерес представляло исследование количественной динамики побего- и корнеобразования при культивировании листовых и стеблевых эксплантов. Исследования показали, что при эксплантации молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 на жидкую модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга,

дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК, первые видимые признаки индукции морфогенеза и образования вегетативных почек обнаруживались на 7-10 сутки культивирования (рис. 3). Этот процесс начинался раньше в культуре листовых эксплантов мяты сортов Симферопольская 200 и Украинская перечная, а спустя 2-3 суток - сортов Заграва, Двухукосная и Прилукская 6. В процессе дальнейшего культивирования из вегетативных почек наблюдалась регенерация микропобегов. Количество микропобегов, развивающихся с одного экспланта (коэффициент размножения), в значительной степени зависело от генотипа донорных растений. В результате за один цикл выращивания культуры (30 суток) количество микропобегов, образовавшихся на одном листовом экспланте изучаемых сортов мяты, было различным.

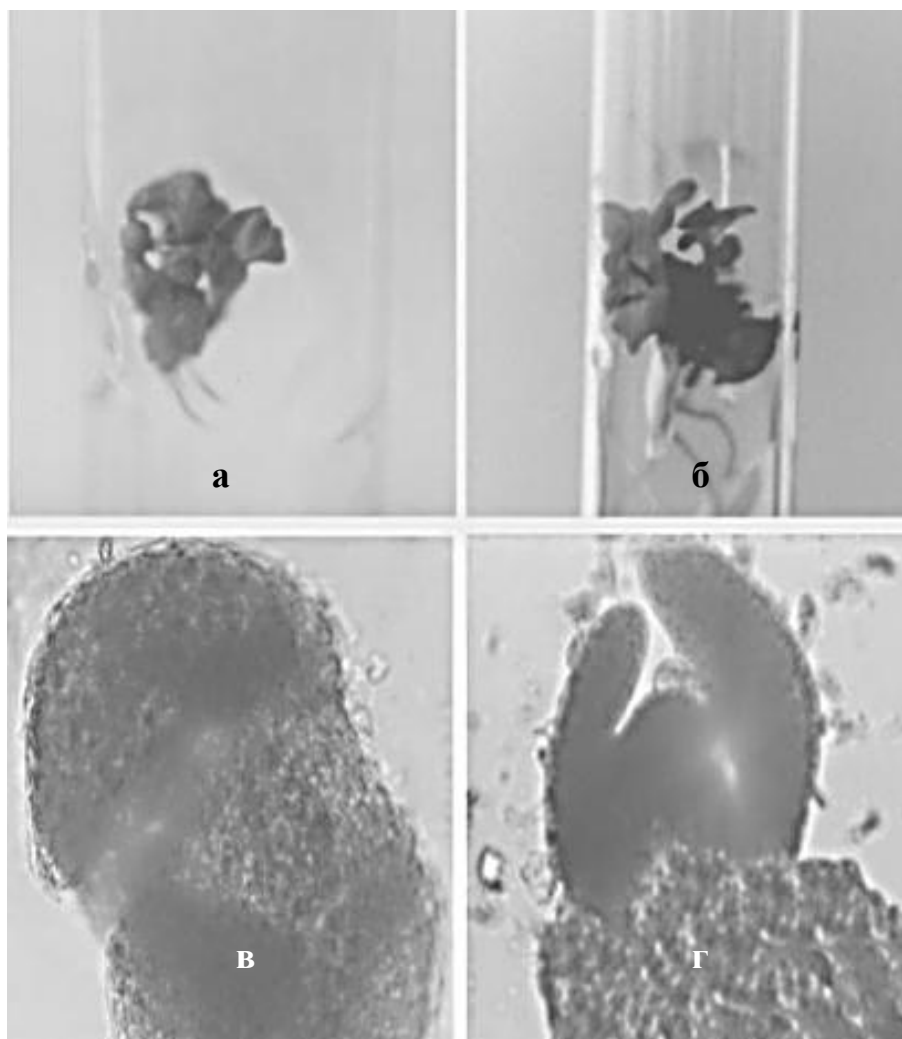


Рис. 1. Прямой органогенез в культуре листовых эксплантов мяты сорта Заграва *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга: а – регенерация микропобегов; б – множественное побегообразование и ризогенез; в, г – дифференциация вегетативных почек из тканей листа

Наибольшее количество адвентивных микропобегов развивалось при культивировании *in vitro* молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва (коэффициент размножения соответственно 1:31 и 1:26). Сорта Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 отличались пониженной способностью к адвентивному побегообразованию (коэффициент размножения 1:22 и 1:23). Образующиеся адвентивные микропобеги на 30 сутки имели нормальную морфологию и 4-5 пар хорошо развитых зеленых листьев без признаков дефектности окраски.

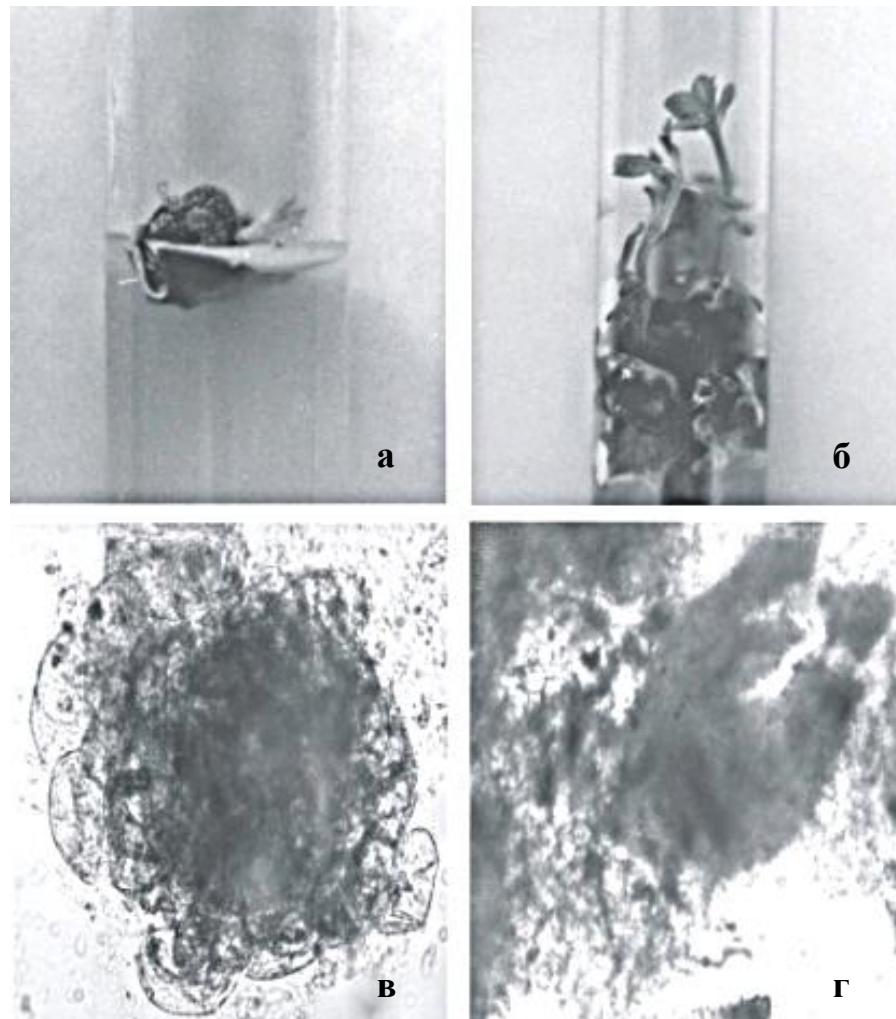


Рис. 2. Непрямой органогенез в культуре стеблевых эксплантов мяты сорта Заграва *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга: а – регенерация микропобегов из первичного каллуса; б – множественное побегообразование и ризогенез; в – локальное скопление клеток меристематического типа в первичном каллусе; г – дифференциация вегетативных почек из клеток меристематического типа

Развитие витрифицированных и аномальных микропобегов в наших экспериментах не было обнаружено. При культивировании свыше 30 суток не наблюдалось дальнейшего увеличения числа адвентивных микропобегов. В данном случае происходило их дальнейшее развитие, что проявлялось в увеличении длины и толщины стебля, а также размеров и числа листьев.

Динамика адвентивного корнеобразования при культивировании листовых эксплантов изучаемых сортов мяты на жидкой питательной среде была до некоторой степени сходна с динамикой адвентивного побегообразования (рис. 4). Первые признаки регенерации корней обнаруживались на 10-12 сутки культивирования, спустя 3-5 суток после заложения вегетативных почек. В процессе дальнейшего культивирования наблюдалось постепенное увеличение числа корней. Наибольшая частота корнеобразования была характерна для сортов Симферопольская 200 и Заграва. Для сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 эти показатели были несколько ниже. В результате одного цикла выращивания культуры из листового экспланта мяты сорта Симферопольская 200 развивалось около 36 адвентивных корней, сорта Заграва – 32, сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 – 22-27. Если процесс культивирования продолжался свыше 30

суток, то так же, как и в случае адвентивного побегообразования, это не приводило к увеличению количества корней. Однако визуально обнаруживались увеличение их размеров, интенсивный рост и активное развитие боковых корней.



Рис. 3. Динамика адвентивного побегообразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга



Рис. 4. Динамика адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

При сопоставлении результатов побего- и корнеобразования в культуре листовых эксплантов изучаемых сортов мяты можно сделать заключение, что развитие корневой системы являлось результатом корнеобразования у формирующихся микропобегов. Об этом могут свидетельствовать количественные показатели. Количество адвентивных микропобегов, развившихся в течение одного цикла выращивания, было приблизительно равно количеству корней. Отсутствие абсолютного равенства в данном случае связано с трудностью подсчета числа корней без травмирования растений, особенно после двух недель культивирования, в результате их интенсивного развития и сложного переплетения между собой.

При культивировании молодых листьев мяты на агаризованной питательной среде наблюдалось некоторое снижение частоты регенерации адвентивных микропобегов по сравнению с жидкой питательной средой (рис. 5). Первые видимые признаки индукции побегообразования обнаруживались у изучаемых сортов на 11-13 сутки, то есть на 3-4 суток позже, чем на жидкой питательной среде. В дальнейшем происходило увеличение количества адвентивных микропобегов. В итоге на 30 сутки культивирования из одного листового экспланта мяты сорта Симферопольская 200 развивалось до 26 адвентивных микропобегов, сорта Заграва – 24, а сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 – 16-20. Таким образом, культивирование молодых листьев на агаризованной питательной среде приводило к ингибированию процесса адвентивного побегообразования и снижению коэффициента размножения в течение одного цикла выращивания по сравнению с жидкой питательной средой.



Рис. 5. Динамика адвентивного побегообразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

Во многом сходная закономерность была выявлена при анализе процесса адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов изучаемых сортов мяты на агаризованной питательной среде (рис. 6).



Рис. 6. Динамика адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

В данном случае первые признаки корнеобразования обнаруживались на 1-2 суток позже, чем при использовании жидкой питательной среды. В течение цикла выращивания наблюдалось постепенное увеличение числа адвентивных корней. На 30 сутки из одного листового экспланта мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 27 корней, сорта Украинская перечная – 22, а у сортов Двухукосная и Прилукская 6 – 16-17. При этом показатели частоты корнеобразования были сопоставимы с показателями частоты адвентивного побегообразования.

Таким образом, при культивировании *in vitro* эксплантов молодых листьев мяты наблюдалась множественная регенерация растений. При этом обнаруживалась зависимость количества микрорастений от консистенции питательной среды, в результате чего коэффициент размножения на жидкой питательной среде был выше, чем на агаризованной.

При эксплантации стеблевых сегментов мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 на жидкую, модифицированную нами питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК, первым видимым проявлением ответной реакции экспланта на условия культивирования являлась индукция каллусогенеза. Каллус возникал на 6-7 сутки культивирования с обоих концов стеблевого сегмента в местах среза, как ответная реакция на поранение. Образующийся каллус имел рыхлую консистенцию и отличался умеренной интенсивностью роста. На 9-10 сутки на поверхности каллуса наблюдалась дифференциация вегетативных почек. На 13-15 сутки, в зависимости от сорта, из образующихся почек развивались микропобеги (рис. 7). Несколько раньше этот процесс начинался в первичном каллусе мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва, а спустя 2 суток у других изучаемых сортов. В процессе культивирования количество микропобегов увеличивалось. На 30 сутки из одного экспланта стеблевого сегмента мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 14 микропобегов. Для мяты сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 этот показатель составил в среднем 12-13. Образующиеся микропобеги имели нормальную морфологию и 3-4 пары листьев без признаков дефектности окраски и витрификации.



Рис. 7. Динамика побегообразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

Видимые признаки корнеобразования обнаруживались в культуре стеблевых сегментов на 14-15 сутки (рис. 8). У сортов Симферопольская 200 и Заграва регенерация корней начиналась на 1 сутки раньше, чем у других сортов. В процессе культивирования наблюдалось увеличение частоты корнеобразования. На 30 сутки культивирования из одного экспланта стеблевого сегмента мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 14 корней. У сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 этот показатель составлял в среднем 10-12.

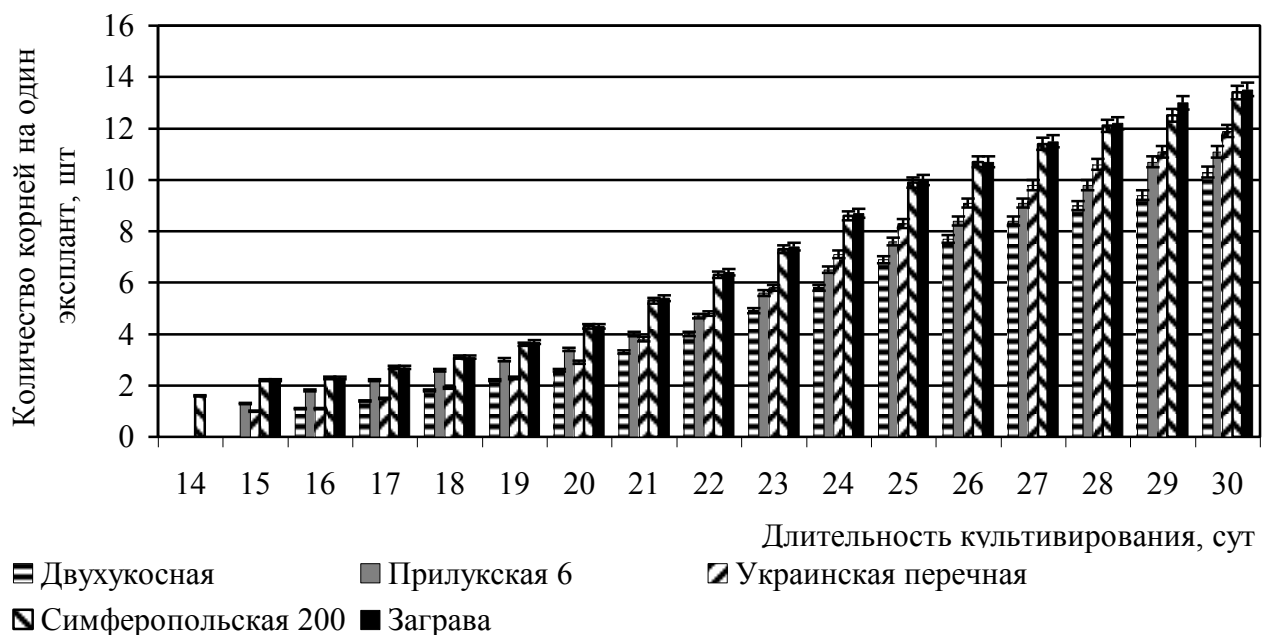


Рис. 8. Динамика корнеобразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

Особенно следует отметить, что в данном случае, также как и при клональном микроразмножении в культуре листовых эксплантов, увеличение цикла выращивания не приводило к дополнительному побего- и корнеобразованию. Показатели коэффициента размножения не изменялись и оставались на постоянном уровне, составляя 1:12-1:14 в зависимости от сорта. Вместе с тем при культивировании свыше 30 суток наблюдалось дальнейшее развитие уже образовавшихся растений, увеличение размеров микропобегов и корней, а также количества листьев.

В отличие от листовых эксплантов, при культивировании сегментов стебля на агаризованной питательной среде не наблюдалось значительных различий как в интенсивности, так и в частоте побегообразования по сравнению с использованием жидкой питательной среды (рис. 9). На агаризованной питательной среде, так же как и на жидкой, индукция побегообразования визуально обнаруживалась на 13-15 сутки в зависимости от сорта. Количество микропобегов на один эксплант на 30 суток находилось приблизительно в тех же пределах, составляло у изучаемых сортов 1:11-1:14 и не изменялось при дальнейшем культивировании. При этом максимальный коэффициент размножения наблюдался у сорта Симферопольская 200. Культивирование стеблевых сегментов на агаризованной питательной среде не приводило к заметным изменениям частоты и интенсивности корнеобразования по сравнению с жидкой питательной средой (рис. 10).

Для адаптации растений-регенерантов, полученных в культуре молодых листьев и стеблевых сегментов к условиям *in vivo*, их переносили в субстрат, состоящий из смеси торфа и керамзита (1:1). При этом приживаемость растений составляла 91,7-100% в зависимости от сорта. По морфологическим признакам растения, полученные в культуре листовых и стеблевых эксплантов *in vitro*, не отличались от контрольных растений, размноженных рассадой. При выращивании в условиях закрытого грунта они нормально развивались, цвели и достигали фазы технической зрелости.

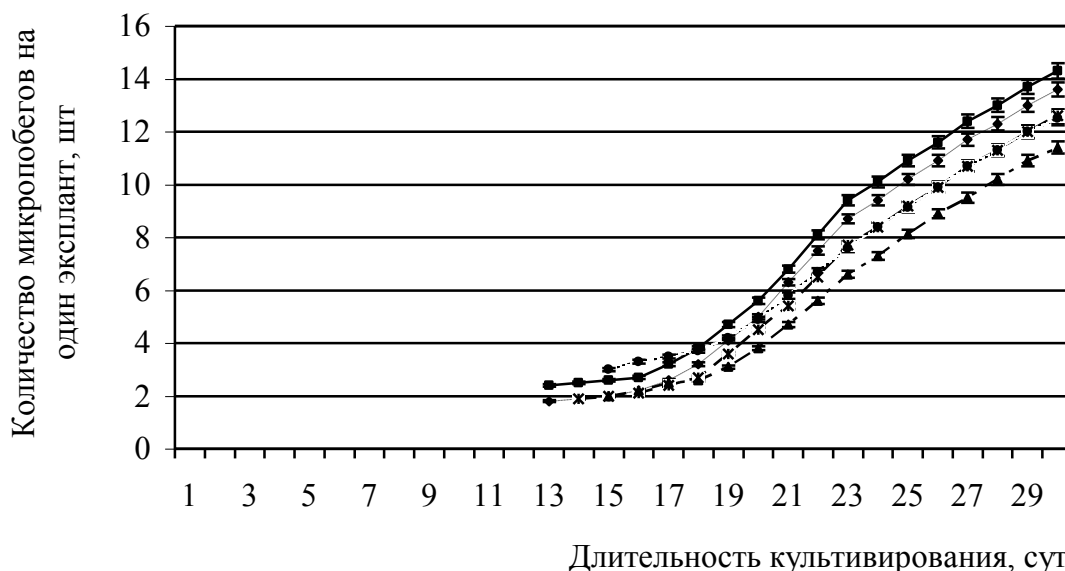


Рис. 9. Динамика побегообразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

- Симферопольская 200; - - - ◆ - - - Заграва;
- *— Украинская перечная; —▲— Двухукосная;
-◆..... Прилукская 6

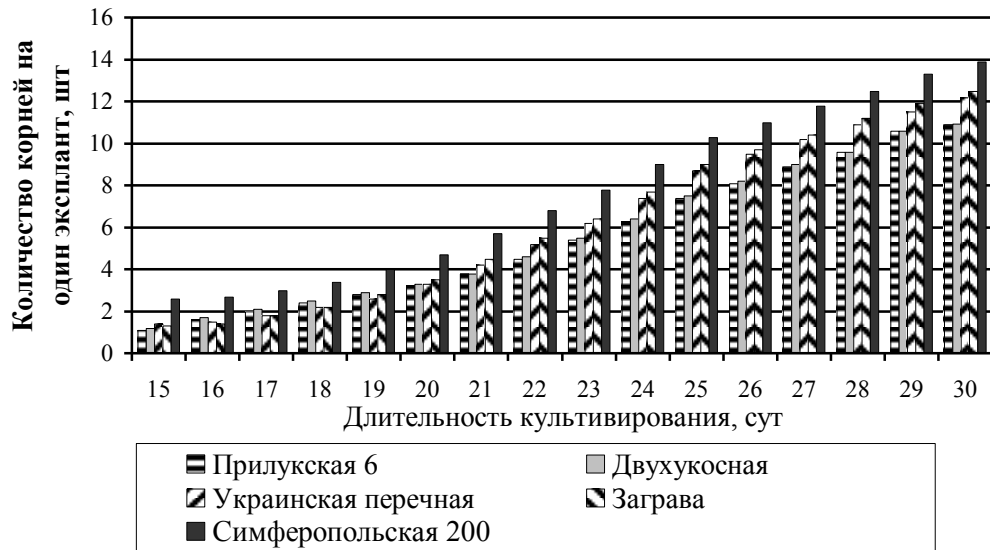


Рис. 10. Динамика корнеобразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось выявить особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре изолированных молодых листьев и стеблевых сегментов изучаемых сортов мяты. При этом были установлены различия в типах регенерации в зависимости от экспланта. Известно, что регенерация растений в условиях *in vitro* может осуществляться как прямым путем, непосредственно из клеток экспланта, так и непрямым путем – через этап каллусообразования [6]. У всех изучаемых сортов мяты были выявлены оба указанных пути. Прямой путь наблюдался при культивировании эксплантов молодых листьев, непрямой – в культуре стеблевых сегментов. В обоих случаях происходила множественная регенерация растений, что позволяет рассматривать разработанную систему как один из подходов к клональному микроразмножению изучаемых сортов мяты. Поскольку культивирование листовых и стеблевых эксплантов различных генотипов мяты проводилось на питательной среде одного состава, можно сделать заключение, что тип регенерации в данном случае детерминирован природой экспланта.

Возможность использования культуры изолированных молодых листьев, а также листовых и стеблевых сегментов для клонального микроразмножения показана для довольно значительного числа видов растений [6, 9, 15, 16]. В ряде случаев была отмечена более высокая морфогенетическая активность эксплантов молодых листьев [9, 13]. Культура *in vitro* молодых листьев была использована для клонального микроразмножения *M. piperita*. Экспланты культивировали на питательной среде Линдсмайера и Скуга, дополненной 0,1 мг/л БАП и 0,1-1,0 мг/л кинетина. Множественное побегообразование начиналось спустя 2 месяца культивирования. Замена агаризованной питательной среды на «полужидкую» (0,4% агара) увеличивало почти в 2 раза количество микропобегов, развивающихся из одного экспланта. С целью индукции ризогенеза микропобеги переносили на питательную среду без фитогормонов [20].

Проведенные нами исследования выявили высокий морфогенетический потенциал молодых листьев различных сортов мяты при эксплантации их на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Особенностью данной питательной среды являлось значительное превышение концентрации цитокинина над концентрацией ауксина. Именно такой экспериментальный подход использовался и другими авторами для индукции органогенеза в культуре листовых эксплантов некоторых видов растений [10, 24].

Возможность клонального микроразмножения путем культивирования *in vitro* эксплантов стеблевых сегментов также показана для ряда видов растений [6, 12, 14]. В

имеющихся литературных данных о размножении в культуре стеблевых сегментов видов *M. arvensis* и *M. piperita* на первом этапе исследователи добивались прямой индукции вегетативных почек (микроробегов) или каллуса на первичной питательной среде. На втором этапе, образующиеся микроробегов переносили на среду для корнеобразования, а каллус на среду для регенерации [19, 21].

Наши исследования позволили разработать более простую систему для клонального микроразмножения мяты через прямой и непрямой пути морфогенеза, предусматривающую получение растений-регенерантов на первичной питательной среде в течение одного цикла выращивания культуры. При таком подходе исключается дополнительный этап, связанный с субкультивированием с целью индукции корнеобразования.

Известно, что при клональном микроразмножении растений путем культивирования *in vitro* различных эксплантов используются как жидкие, так и агаризованные питательные среды. Культивирование эксплантов на жидкой питательной среде иногда имеет преимущество по сравнению с поверхностным культивированием на агаризованной питательной среде. Считают, что жидкая питательная среда обеспечивает большую подвижность и доступность трофических факторов [4, 23]. Эффективность жидкой и агаризованной питательных сред для клонального микроразмножения в культуре листовых эксплантов проанализирована в небольшом количестве работ. При этом было показано, что регенерация растений из эксплантов листовых сегментов лучше проходила на жидкой питательной среде [9]. Однако, по-видимому, выбор консистенции питательной среды должен решаться индивидуально для каждого конкретного случая. Использование жидкой питательной среды может не давать заметного преимущества при клональном микроразмножении, а иногда ее эффективность даже хуже, чем при использовании агаризованной среды [12]. Результаты проведенных нами исследований показали целесообразность использования для клонального микроразмножения изучаемых сортов мяты жидкой питательной среды, обеспечивающей более высокий коэффициент размножения при культивировании *in vitro* молодых листьев. Однако данный факт следует рассматривать, вероятно, как частный случай, а не как общую закономерность. Это нашло подтверждение в результатах наших исследований, показавших, что при клональном микроразмножении в культуре стеблевых эксплантов не наблюдалось различий в коэффициенте размножения в зависимости от консистенции питательной среды (жидкая или агаризованная).

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана экспериментальная система для клонального микроразмножения мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 при использовании в качестве эксплантов молодых листьев и стеблевых сегментов. Разработанный подход позволяет проводить клональное микроразмножение сортов, имеющих различную генетическую основу, путем культивирования эксплантов на питательной среде одного состава. При этом в течение одного цикла выращивания культуры происходит формирование укорененных микроробегов, что исключает проведение дополнительного этапа культивирования с целью индукции корнеобразования и делает разработанную систему более технологичной с точки зрения практической реализации.

Выводы

Исследованы особенности морфогенеза в культуре изолированных молодых листьев и стеблевых сегментов мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Двухукосная, Украинская перечная и Прилукская 6 на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Установлено, что в культуре листовых эксплантов морфогенез и регенерация растений осуществлялись прямым путем непосредственно из клеток листа. В культуре стеблевых эксплантов регенерация растений происходила непрямым путем через этап каллусообразования. Разработана система множественной регенерации растений мяты *in vitro*, что позволяет использовать ее для

клонального микроразмножения изученных сортов в течение одного цикла выращивания культуры с коэффициентом размножения 1:14-1:31 в зависимости от генотипа и типа экспланта.

Список литературы

1. Бидюкова Г. Ф., Кириченко Е. Б. Репродуцирование *in vitro* растений мяты и их продукционная оценка // Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Евразия, 2001. – Т. 2. – С. 165-175.
2. Бугаенко Л. А., Шило Н. П., Шульга Е. Б., Мишнёв А. В. Использование межвидовой гибридизации и экспериментальной полиплоидии для создания сортов мяты с комплексом хозяйственно ценных признаков // Труды КГАУ. – 1999. – Вып. 62. – С. 244-253.
3. Бугара И.А., Бугара А.М. Некоторые особенности клонального микроразмножения мяты на основе культуры изолированных меристем *in vitro* // Бюл. Никит. бот. сада. – 2002. – Т.86. – С. 49-53.
4. Бутенко Р. Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
5. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 111-126.
6. Митрофанова И. В. Микроразмножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
7. Паушева Л. А. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
8. Родов В. С., Давыдова О. А. Размножение мяты методом культуры меристем // Труды ВНИИЭМК. – 1987. – Т. 18. – С. 78-83.
9. Bobak M., Blehova A., Krist J., Ovecha M., Samaj J. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – Vol. 43, N 1. – P. 43-49.
10. Canhoto J. M., Cruz G. S. *In vitro* multiplication of *Actinida chinensis* Planch. by culture of yang leaves // Bol. da Soc. Broteriana. – 1987. – Vol. 2, N 60. – P. 239-252.
11. Chapman A., Blervacq A., Tissier J., Delbereil B., Vasseur J., Hilbert J. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. I. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways // Can. J. Bot. – 2000. – Vol. 78, N 6. – P. 816-823.
12. Correia D., Natal G. A., Zavate C., Ribero M. C. Efeito domeio de cultura liquido e solido no crescimento e desenvolvimento de gamas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na multiplicação *in vitro* // PEF. – 1995. – N 48-49. – P. 107-116.
13. Jaksmanan P., Siew K., Joh C., Goh C. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissue of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) // Plant and Cell Physiol. – 1997. – Vol. 38, N 1. – P. 59-64.
14. Le C. L. Culture *in vitro* du gene blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.) // Rev. suisse viticult., aboricuct. et horticult. – 1998. – Vol. 30, N 3. – P. 153-156.
15. Manickavasagam M., Ganapathi A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of sugarcane // India J. Exp. Biol. – 1998. – Vol. 36, N 8. – P. 832-835.
16. Mix-Wagner G., Eneva T. Plant regeneration from *Cichorium intybus* L. var. *sativum* leaf explants induced by ancymidos supplementer culture medium // Londbauforsch. Vvolkenrode. – 1998. – Vol. 48, N 2. – P. 53-55.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473-497.
18. Pavingerova D., Briza J., Prenerova E. Obvozeni primarnich kultur z kvetnich pupenu rododendrromu // Rostl. vyroba. – 2000. – Vol. 46, N 6. – P. 281-286.

19. Phannipha C., Suttikan S., Phongsri S., Atchara T. Appropriated condition for shoot initiation of certain plant // *Indian J. Biotech.* – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 185.
20. Repcakova K., Rychlova M., Cellarova E., Houcariv R. Micropropagation of *Mentha piperita* L. through tissue cultures // *Herba hung.* – 1986. – Vol. 25, N 2. – P. 77-88.
21. Savithri B., Gupta S. K., Tuli R., Khanuja S. P. S., Sharma S., Bagchi G. D., Anil K., Sushil K. Micropropagation of mint // *Current Science.* – 2001. – Vol. 80, N 7. – P. 878.
22. Sunandakumari C., Martin K. P., Chithra M., Sini S., Madhusoodanan Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice *Mentha piperita* L. // *Indian J. Biotech.* – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 108- 112.
23. Suri S., Arora D., Ramawat K. A method for large-scale multiplication of *Curculigo orchioides* through bulbils formation from leaf explant in shake flask culture // *Indian J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 38, N 2. – P. 145-148.
24. Tao R., Murayama H., Mariguchu K., Sugiura A. Plant regeneration from callus culture derived from primordial leaves of adult *Japanese persimmon* // *HortScience.* – 1988. – Vol. 23, N 6. – P. 1055-1056.

Morphogenesis and clonal micropropagation in leaves and stems explants of mint *in vitro*
A.M. Bugara, I.A. Bugara

The methods of clonal micropropagation of mint cultivars Simferopolskaya 200, Zagrava, Ukrainskaya perechnaya, Dvuhukosnaya and Prilukskaya on the basis of the culture of isolated leaf and stem explants have been elaborated. It was shown that the culture of leaf and stem explants ensures multiplication coefficient 1:14-1:31 depending from genotype and type explants.

**ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ АРАЛИЕВЫХ:
МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И УСТАНОВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ**

В.И. ГРИШКОВЕЦ¹, доктор химических наук;

В.Я. ЧИРВА¹, доктор химических наук;

В.В. КАЧАЛА², кандидат химических наук;

А.С. ШАШКОВ², доктор химических наук

¹Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва)

Тритерпеновые гликозиды (сапонины) представляют собой один из очень многочисленных классов природных соединений и относятся к вторичным метаболитам сложного или смешанного биогенеза. Терпеноидная часть (агликон) тритерпеновых гликозидов является метаболитом мевалоновой кислоты, а углеводные части – метаболитами глюкозы или других моносахаридов [1]. Главные группы тритерпеноидов и соответственно их гликозидов представлены тетрациклическими производными рядов ланостана (А), циклоартана (В), даммарана (С) и эуфана (D), а также пентациклическими производными рядов урсана (Е), олеанана(F), лупана (G) и гопана (H) [2] (рис. 1).

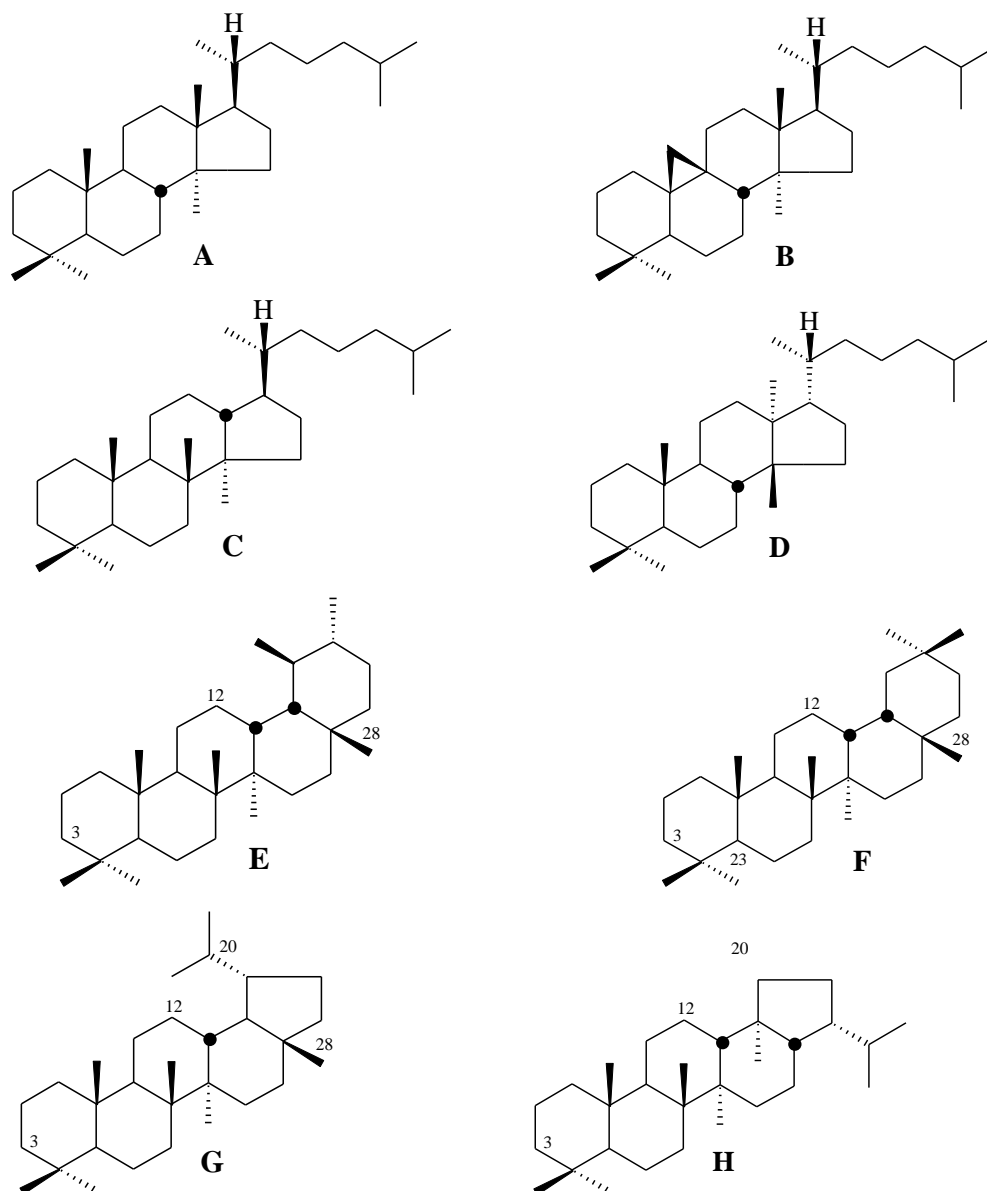


Рис. 1. Главные группы тетра- и пентациклических тритерпеноидов

Неослабевающий интерес к природным тритерпеновым гликозидам обусловлен не только чисто научными вопросами выделения и установления структур новых гликозидов, часто с необычными структурами углеводных или агликонных частей, а также использованием сведений о распространении гликозидов для решения проблем разграничения видов, родов, семейств, но и тем, что сапонины обнаруживают чрезвычайно широкий спектр биологической активности. Большинство изученных тритерпеновых гликозидов обладают тем или иным видом действия на клеточном или организменном уровне. У сапонинов обнаружены следующие виды биологической активности: антимикробная, фунгицидная, антибактериальная, противовирусная, цитотоксическая и антираковая, антимуtagenная, ихтиотоксическая, моллюскицидная, спермицидная и контрацептивная, инсектицидная, антигельминтная, диуретическая, кардиоваскулярная, противовоспалительная, антиэкссудативная, анальгетическая, иммуномодулирующая, адаптогенная, седативная, гипогликемическая, антиаллергическая и другие [3], а также аллелопатическая активность в биоценозах [4]. Кроме того, сапонины и экстракты сапониноносных растений в последнее время все шире используются в коммерческих масштабах в пищевой промышленности, сельском хозяйстве [4] и медицине [5]. Особое значение для медицины представляют выявленные у ряда тритерпеновых гликозидов, в частности, из

южноамериканского растения *Quillaja saponaria*, иммуноадьювантные свойства и возможность использования в вакцинах для человека [6].

Большой интерес к тритерпеновым гликозидам растений семейства аралиевых (*Araliaceae*) во многом обусловлен уже давно завоевавшими мировое признание фармакологическими, главным образом стимулирующими центральную нервную систему, и адаптогенными свойствами препаратов на основе женьшеня (*Panax ginseng*), элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus*), заманихи (*Oplopanax elatus*), аралии (*Aralia mandshurica*), действующим началом которых, по всеобщему признанию, являются тритерпеновые гликозиды [7]. Разработанные в последнее время на основе плюща обыкновенного *Hedera helix* препараты "Prospan" и "Hedelix" успешно используются при лечении острых и хронических воспалений дыхательных путей, кашля и как спазмолитические средства. Целый ряд других растений семейства аралиевых широко применяется в народной медицине при лечении самых различных заболеваний [8], а также занимает важное место в традиционной Восточной медицине [9].

Предварительный ТСХ-анализ экстрактов растительного сырья

Первичная качественная оценка растительного сырья на наличие и состав тритерпеновых гликозидов проводится путем одномерного хроматографирования водно-спиртовых экстрактов различных органов растений на тонких слоях силикагеля в различных хроматографических системах растворителей. Наилучшее разделение достигается в системах растворителей на основе смеси хлороформа и метанола (в различных соотношениях в зависимости от полярности разделяемых соединений), насыщенной водой, водным аммиаком или водным раствором муравьиной кислоты.

Очень часто гликозидный состав аралиевых представлен достаточно сложными смесями, включая и изомерные гликозиды с очень близкими хроматографическими подвижностями, так что использование одномерного хроматографического анализа даже в различных хроматографических системах не позволяет добиться полного разделения всех компонентов и носит лишь предварительный характер. Для аналитического разделения многокомпонентных природных смесей гликозидов единственный простой путь для существенного повышения разрешающей способности – использование двумерной ТСХ с различными системами растворителей в двух направлениях. Метод двумерной ТСХ принципиально хорошо известен и широко используется в разделении многокомпонентных смесей природных соединений, в особенности фенольных гликозидов, аминокислот, алкалоидов и целого ряда других веществ [10]. Из работ по двумерной ТСХ тритерпеновых гликозидов можно отметить статью по двумерному разделению даммарановых гликозидов *Panax trifolius* [11] и статью по использованию двумерного варианта ТСХ-анализа природных гликозидсодержащих экстрактов с целенаправленно выбираемыми системами растворителей [12].

В качестве специфических детектирующих реагентов для одно- и двумерного ТСХ-анализов применяются спиртовые растворы фосфорновольфрамовой кислоты, иногда с добавлением ароматических альдегидов (*n*-оксибензальдегида или ванилина) для усиления окраски хроматографических зон.

ТСХ-анализ спиртовых экстрактов различных органов растений позволяет полуколичественно оценить и содержание отдельных компонентов. Хорошо известно, что ТСХ может использоваться для количественного определения компонентов хроматографируемых смесей путем оценки интенсивности окраски пятен [10] или их площади (диаметра) [13]. Первый вариант метода точнее, но требует применения специального фотометрического оборудования.

Подготовка растительного сырья, выделение и предварительная очистка суммы гликозидов

Для выделения гликозидов обычно используются достаточно однотипные схемы, представляющие собой лишь несущественные видоизменения классической схемы

Кочеткова-Хорлина: воздушно-сухое сырье тщательно измельчается, обрабатывается смесью бензола с хлороформом для удаления восков, жиров и прочих малополярных соединений и затем гликозиды исчерпывающе экстрагируются 80%-ным водным изопропиловым спиртом. Объединенные спиртовые экстракты упариваются досуха, остаток растворяется в бутаноле, насыщенном водой, и для удаления сильнополярных соединений (свободных моно- и олигосахаридов, солей и некоторых фенольных соединений) бутанольный слой промывается водой или водным аммиаком.

Промывка водным аммиаком в сравнении с водой дает значительно лучшие результаты, так как при этом удаляется и большая часть фенольных гликозидов, переходящих при этом в водно-аммиачный слой в виде сильнополярных фенолятов. Однако при наличии в сырье гликозидов с ацильными группами метод промывки водным аммиаком неприменим.

Следует отдельно отметить, что измельчение свежесобранного (не высушенного) растительного материала и выделение гликозидов по вышеописанной схеме приводит к существенному преобладанию в экстракте монодесмозидных гликозидов, тогда как получение экстрактов из высушенного перед измельчением сырья дает сумму гликозидов с существенным преобладанием бисдесмозидных гликозидов. Этот эффект объясняется тем, что в растительных тканях имеется специфическая гликозидаза, расщепляющая ацилгликозидную связь, что и приводит к превращению бисдесмозидных гликозидов в монодесмозидные. Хотя наличие подобных ферментов в растениях и характер их действия на нативные гликозиды известны достаточно давно [14, 15], этому факту обычно не уделялось должного внимания.

Разделение суммы гликозидов на фракции и индивидуальные компоненты

Очищенная сумма тритерпеновых гликозидов подвергается препаративному хроматографическому разделению на силикагеле с использованием чаще всего градиентного элюирования нейтральной системой растворителей хлороформ-этанол или хлороформ-метанол (10:1→1:1), насыщенными водой. В результате получают индивидуальные гликозиды или узкие фракции близких по хроматографической подвижности гликозидов. Гликозидные фракции разделяют на индивидуальные соединения путем рехроматографирования на силикагеле или других сорбентах.

Химические методы в установлении частичной структуры выделенных гликозидов

В настоящее время такие классические химические методы установления структуры углеводсодержащих соединений как метилирование, периодатное окисление, распад по Смиту и ряд других [3] в связи с появлением многочисленных методик спектроскопии ЯМР используются крайне редко, поскольку требуют значительных количеств веществ. В работе современных исследователей из химических методов используют главным образом гидролитические методы для получения первичной информации о структурных единицах гликозидов и в большинстве случаев для установления предварительных структур гликозидов без определения типов и конфигураций гликозидных связей [3, 16].

Полный кислотный гидролиз используют для установления агликонного и моносахаридного состава гликозидов путем идентификации продуктов гидролиза с заведомыми образцами агликонов и моносахаридов. Частичный кислотный гидролиз – для установления последовательности соединения моносахаридных остатков в гликозидах путем идентификации или выделения продуктов частичного гидролиза [16].

Щелочной гидролиз используется для расщепления ацилгликозидной связи в исследуемых бисдесмозидных гликозидах и превращения их таким образом в монодесмозидные прогенины, которые или идентифицируют с заведомыми образцами, или подвергают дальнейшему установлению строения. Мягкий щелочной гидролиз водно-спиртовым раствором бикарбоната натрия или аммиака используют для избирательного

удаления нативных сложноэфирных (обычно ацетильных) групп при сохранении ацилгликозидной связи [3]. Из прочих химических методов используют метилирование диазометаном для доказательства наличия свободных карбоксильных групп в составе гликозида в агликонной части или в виде остатка глюкуроновой кислоты [3].

Ферментативные методы в установлении частичной структуры выделенных гликозидов

В ряде случаев особенно информативными с точки зрения установления структуры оказываются методы ферментативного гидролиза. Наиболее часто в работах используется сумма гликозидаз, полученная из желудочного сока виноградной улитки *Helix pomatia* [3]. Хорошо известно, что этот ферментный препарат содержит экзогликозидазу, и способен отщеплять лишь концевые остатки β -глюкозы с любым типом связи. Это свойство и используется для высокоселективного отщепления концевых остатков глюкозы и выделения прогенинов более простого или же обычно известного строения. Реже используются другие суммарные ферментные препараты, такие как нарингиназа, гесперидиназа или же индивидуальные гликозидазы [3].

Методы ЯМР-спектроскопии в установлении структуры выделенных гликозидов

Предварительный анализ спектров ЯМР выполняется на основе данных вышеописанных химических методов, прежде всего данных по установлению моносакхаридного состава и в ряде случаев (при наличии заведомых образцов) идентификации агликонной части.

Одномерные спектры ^1H -ЯМР позволяют, прежде всего, точно определить число моносакхаридных остатков по количеству дублетных сигналов аномерных протонов в сравнительно низкочастотной области (4,6 – 6,3 м.д.), а по величине константы спин-спинового взаимодействия КССВ $J_{1,2}$ и химическому сдвигу с учетом литературных данных иногда и однозначно отнести к тому или иному моносакхаридному остатку. Последняя задача сравнительно легко решается лишь для остатков арабинофуранозы, рамнопиранозы и арабинопиранозы, имеющих КССВ $J_{1,2}$ соответственно в 1,0, 1,5 и 6-7 Гц, что явно отличает их от КССВ $J_{1,2}$ для остатков глюкопиранозы, глюкуронопиранозы, галактопиранозы и ксилопиранозы, которые имеют практически одинаковые КССВ $J_{1,2}$ около 8 Гц. Кроме того, в низкочастотной области (выше 5 м.д.) обычно легко идентифицируются псевдотриплетные сигналы винильного протона Н-12 агликонной части гликозидов α - и β -амириновых рядов, протона Н-16 β (5,2-5,3 м.д.) в 16 α -гидроксипроизводных агликонов этих же рядов, синглетный сигнал альдегидного протона Н-23 (около 9,8 м.д.) в гликозидах гипсогенина, а в высокочастотной области (0,8–1,3 м.д.) – синглетные сигналы метильных групп у четвертичных С-атомов агликонной части. Достаточно легко также идентифицируются дублетные сигналы метильной группы (Н-6) остатков рамноз в области -1,7 м.д. с КССВ $J_{5,6}$ 6,5 Гц. В спектрах гликозидов с ацетильными группами также легко удается идентифицировать их синглетные сигналы в области 1,9-2,2 м.д. и определить число этих групп в молекуле. В ряде случаев можно идентифицировать и специфически расщепленные дублет-дублетные сигналы протонов Н-3 и Н-18 агликонных частей гликозидов α - и β -амиринового рядов в области 3,0-4,3 м.д., когда они не перекрывались с сигналами скелетных протонов углеводных частей гликозида.

Скелетные протоны углеводных фрагментов (кроме вышеотмеченных аномерных протонов и протонов Н-6 остатков рамноз) находятся в довольно узкой области 3,5-4,8 м.д. и в случае двух и более сахаров неизбежно перекрываются даже при использовании приборов на 500 МГц. Аналогичная ситуация наблюдается и для большинства скелетных протонов агликонной части, находящихся в области 0,8-2,3 м.д. Непосредственный анализ этих частей спектров невозможен. Поскольку химические сдвиги и, прежде всего КССВ скелетных

протонов моносахаридных остатков, несут информацию об их природе, то отнесения сигналов в этой области очень важны и выполняются обычно с использованием двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY с двухквантовой фильтрацией [17]. Однако даже на спектрах, полученных на приборах с рабочей частотой 500 МГц, далеко не всегда удается выполнить полные отнесения сигналов скелетных углеводных протонов в случае четырех-пяти и более моносахаридных остатков, особенно при наличии нескольких стереохимически подобных моносахаридов.

Кардинальным решением в нахождении и отнесении сигналов протонов каждого моносахаридного остатка, представляющих собой изолированные спиновые системы, стало использование в сочетании с COSY двумерной методики по наблюдению полных корреляций TOCSY [18]. В спектре TOCSY, от аномерных протонов Н-1 (или от Н-6 для остатков рамноз) наблюдаются кросс-пики не только с собственными соседними протонами Н-2 (или Н-5), но и всеми прочими скелетными протонами собственных моносахаридных остатков. Определенные проблемы здесь возникают лишь в тех случаях, когда сигналы аномерных протонов либо перекрываются, либо расположены на расстоянии менее $1,5-2J_{1,2}$. Определение характера расщепления и КССВ скелетных протонов моносахаридных остатков возможно на контурном представлении двумерного спектра TOCSY, однако значительно нагляднее и удобнее выполняется на одномерных сечениях по ν_1 на частотах аномерных протонов.

Найденные на основании вышеперечисленных методов величины КССВ для моносахаридных остатков определяют прежде всего взаимное расположение вицинальных скелетных протонов (*aa*, *ae*, *ee*) на основании хорошо известных зависимостей вицинальных констант 3J от величин двугранных углов между НСС-плоскостями в жестких циклических системах (уравнения Карплуса) [19], а тем самым определяют ориентацию гидроксильных групп и соответственно стереохимическую конфигурацию асимметрических С-атомов в моносахаридных остатках, то есть их химическую природу, а величины 3J для аномерных протонов (то есть $J_{1,2}$) определяют α - или β -конфигурацию гликозидной связи.

Аналогично отнесению сигналов скелетных протонов моносахаридных остатков в ряде случаев с использованием двумерных методик COSY и TOCSY выполнялись отнесения и для скелетных протонов агликонных частей в области 0,8-2,5 м.д., начиная от однозначно опознаваемых и расположенных в относительно низкопольной области сигналов Н-3, Н-5, Н-12, Н-16, Н-18 и ряда других, входящих в изолированные спиновые системы. А анализ величин КССВ позволял в случае необходимости устанавливать или подтверждать конфигурацию интересующих С-атомов в циклах агликоновой части гликозидов.

Спектроскопия протонного магнитного резонанса полных ацетатов тритерпеновых гликозидов позволяет, с одной стороны, достичь лучшего разрешения мультиплетов по сравнению со спектрами исходных гликозидов вследствие значительно большего диапазона химических сдвигов сигналов скелетных протонов (от 3,5 до 6,0 м.д.) из-за того, что при ацетилировании свободных гидроксильных групп соответствующие скелетные протоны испытывают значительные низкопольные сдвиги от 1 до 1,5 м.д. С другой стороны, это позволяет получить ценную и однозначную информацию о типах гликозидных связей, поскольку скелетные протоны у С-атомов, образующих гликозидные связи, не испытывают эффектов ацетилирования, и их сигналы находятся в области 3,5-4,7 м.д. В этой же области находятся еще лишь легко опознаваемые вследствие специфического характера расщепления сигналы скелетных протонов Н-5 сахаров в пиранозной форме. Сигналы же остальных скелетных протонов оказываются в отдельной, более низкопольной области 4,9-6,0 м.д.

Анализ эффектов ацилирования использовался и при определении положения нативных сложноэфирных (обычно ацетильных) групп в углеводных частях ряда гликозидов. Как правило, для этого изучался двумерный спектр COSY (в сочетании с TOCSY), и необычное низкопольное положение (по одной из частотных осей) кросс-пика сигнала определенного скелетного протона однозначно свидетельствовало о наличии О-ацильной группы у соответствующего С-атома.

С точки зрения структурных исследований гликозидов, ценная информация получалась регистрацией одномерных спектров ЯМР по наблюдению ядерных эффектов Оваерхаузера (ЯЭО) при преднасыщении аномерных протонов [20]. Значительный структурный интерес представляет обнаружение ЯЭО на сигналах скелетных протонов агликона или другого моносахаридного остатка, связанного с аномерным центром облучаемого Н-1 гликозидной связью. Так, проявление ЯЭО, например, на протоне Н-3 агликонной части гликозида свидетельствует о присоединении данного моносахаридного остатка по гидроксильной группе у С-3 агликона. Аналогичное проявление ЯЭО при преднасыщении аномерного Н-1 на определенном скелетном протоне другого моносахаридного остатка однозначно указывает на последовательность их соединения и тип гликозидной связи.

Использовавшийся нами двумерный эксперимент по наблюдению ЯЭО – NOESY [21] дает качественно ту же информацию (корреляции за счет диполь-дипольных взаимодействий при пространственной сближенности протонов), что и одномерный вариант с преднасыщением аномерных протонов. Более современная двумерная методика ROESY [22] по наблюдению ЯЭО во вращающейся системе координат отличается от методики NOESY тем, что здесь ЯЭО всегда отрицательны и нет проблем с нулевыми ЯЭО.

Анализ ROESY спектра для агликонной части гликозидов выполняют лишь при отсутствии предварительных данных о природе агликона и начинают с кросс-пиков от протона Н-3 или ряда других легко и однозначно интерпретируемых сигналов протонов в низкопольной части спектра (например, винильного протона Н-12), последовательно прослеживая корреляции с другими протонами. При этом дополнительно для идентификации протонов и их корреляции через КССВ используют спектры COSY и TOCSY.

Спектры ЯМР-¹³С с полным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами наиболее информативны для установления структур гликозидов. Это объясняется рядом хорошо известных причин – очень высокой воспроизводимостью значений химических сдвигов сигналов С-атомов ($\pm 0,1-0,2$ м.д.), слабой зависимостью химических сдвигов от внешних факторов (температура, концентрация, наличие примесей и т.д.), узкой шириной линий и широким спектральным диапазоном, практически исключая их перекрывание. Все это делает спектроскопию ЯМР-¹³С очень ценной в идентификации известных соединений по величинам химических сдвигов сигналов. При этом степень надежности идентификации является исключительно высокой. Такой способ идентификации постоянно использовался нами при выделении гликозидов с уже установленными нами или другими авторами структурами после получения первичной информации путем идентификации гликозидов по хроматографической подвижности и идентификации продуктов полного кислотного и щелочного гидролиз. В ряде случаев такой подход позволял выявить изомерные соединения, например гликозиды урсоловой кислоты в смеси с гликозидами олеаноловой кислоты, которые хроматографически неразделимы, 23-О-глюкозилированные производные хедерагенина вместо обычно встречающихся 3-О-глюкозидов, гликозиды с различными положениями нативных ацетатных групп, изомерные гликозиды с остатком галактозы вместо остатка глюкозы и так далее.

Анализ обзорного спектра ЯМР-¹³С прежде всего позволял выявлять наличие сигналов карбонильных С-атомов в области выше 160 м.д. – а именно сигналов углерода альдегидной группы в гликозидах гипсогенина (~210 м.д.), углеродов свободной карбоксильной группы агликона (~180 м.д.), гликозилированной карбоксильной группы агликона (~176 м.д.), карбоксильных углеродов остатков глюкуроновой кислоты (~170-174 м.д.), карбонильных углеродов ацетильных групп (~171 м.д.), углерода карбоксильной группы, сопряженной с двойной связью, в остатке кофейной кислоты (~168 м.д.). Анализ области 107-150 м.д. позволял выявить сигналы олефиновых и ароматических С-атомов и сделать предварительные заключения об их принадлежности. Так наиболее часто встречающийся тип двойной связи у С-12 ($\Delta^{12,13}$) в тритерпеноидах β -амиринового ряда характеризуется значениями химических сдвигов ~123 и ~145 м.д. для атомов С-12 и С-13, соответственно.

Тритерпеноиды α -амиринового ряда с таким же типом двойной связи – значениями соответственно ~126 и 139 м.д. Тритерпеноиды лупанового ряда с 20(29)-двойной связью характеризуются химическими сдвигами в ~151 и ~110 м.д. для атомов С-20 и С-29, соответственно, а 30-нортритерпеноиды имеют дополнительную 20(29)-двойную связь с химическими сдвигами С-атомов в ~148 и ~108 м.д.

Следующая высокоинформативная область углеродного спектра – 95-109 м.д., в которой в тритерпеновых гликозидах располагаются исключительно сигналы аномерных С-атомов углеводных остатков, так что простой анализ сигналов в этой области однозначно указывает на количество моносахаридных остатков в молекуле гликозида. Анализ величин химических сдвигов сигналов в этой области позволяет сделать предварительные заключения и о природе моносахаридных остатков. Так в самой низкопольной части этой области (108-109 м.д.) располагается сигнал С-1 арабинофуранозы, в области 106-108 м.д. – сигнал С-1 ксилопиранозы, в области 104-107 м.д. – сигналы С-1 остатков глюконопиранозы, галактопиранозы, арабинопиранозы и глюкопиранозы, в области 101-103 м.д. – С-1 рамнопиранозы и в области 95-97 м.д. – С-1 глюкопиранозы, связанной ацилгликозидной связью с агликоном. Однако ситуация несколько усложняется в случае 2-О-ацетилированных или 2-О-гликозилированных сахаров, так как при этом сигнал С-1 испытывает высокопольный сдвиг (β -эффект замещения) на 1,5-2 м.д.

В области 61-88 м.д. располагаются сигналы прочих скелетных протонов моносахаридных остатков. Однако в самой низкопольной части этой области (87-88 м.д.) может находиться лишь сигнал атома С-4 арабинофуранозы, в области 78,5-85 м.д. – сигналы С-2 и С-3 арабинофуранозы и лишь сигналы гликозилированных С-атомов сахаров в пиранозной форме, в области 61-79 м.д. – сигналы как незамещенных, так и замещенных (гликозилированных, ацилированных) атомов С-2-С-5 сахаров, а в области 61-70 м.д. – сигналы атомов С-6 гексопираноз, С-5 пентопираноз, арабинофуранозы и рамнопиранозы и С-4 арабинопиранозы и галактопиранозы. К сожалению, в область 61-88 м.д. попадают и сигналы агликонных С-атомов, у которых имеется гидроксильная группа, что иногда существенно усложняет анализ этой части спектра. В оставшейся высокопольной области спектра 12-57 м.д. располагаются сигналы остальных С-атомов агликонных частей гликозидов и сигналы С-6 остатков рамноз (~18-19 м.д.).

Как указывалось в предыдущем разделе, для отнесения сигналов в одномерном углеродном спектре обязательно необходима какая-либо априорная информация о структуре фрагментов и данные по химическим сдвигам сигналов С-атомов в аналогичных фрагментах иных соединений, полученные тем или иным способом. Однако во многих случаях такие данные или отсутствуют, или не являются надежными, поскольку отнесения обычно выполнены косвенными методами (расчетами, сопоставлением данных по различным производным, анализом ^{13}C -ЯМР-спектров с частичной релаксацией и тому подобное).

Использование двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии HETCOSY [23] практически полностью решило проблему однозначного отнесения сигналов в углеродном спектре (по крайней мере для углеводных частей) по кросс-пикам сигналов непосредственно связанных С- и Н-атомов, поскольку обычно имеются однозначные отнесения сигналов протонов в ПМР-спектре, выполненные с помощью корреляционных методик COSY, TOCSY и ROESY. Существенным недостатком спектроскопии HETCOSY, ограничивающим ее применение, является низкая чувствительность. Эта проблема в значительной степени решилась с появлением обращенной корреляционной методики HSQC (гетероядерная корреляция через одну связь) [24].

Возможности полного и однозначного отнесения углеродных сигналов углеводных частей гликозида с помощью методики HSQC позволяют однозначно решить целый ряд структурных задач. Так, α -эффекты гликозилирования (на гликозилируемых С-атомах), в сравнении с химическими сдвигами С-атомов незамещенных гликозидов сахаров, положительны и обычно составляют от 5 до 11 м.д., напротив, β -эффекты на соседних С-

атомах отрицательны и обычно не превышают 3 м.д. Эти закономерности при анализе найденных химических сдвигов сигналов С-атомов углеводных частей позволяют однозначно определять типы гликозидных связей или же определять концевые моносахаридные остатки, на которых эффекты гликозилирования отсутствуют. Данный способ определения типов гликозидных связей является прямым и наиболее надежным.

Кроме установления типов гликозидных связей анализ наблюдаемых величин химических сдвигов и эффектов замещения позволяет установить и места присоединения ацильных групп в углеводных частях гликозидов. Наблюдаемые при этом α -эффекты ацилирования в любые положения положительны и обычно составляют от 1,5 до 3,5 м.д., что заметно меньше α -эффектов гликозилирования, тогда как β -эффекты, как и в случае гликозилирования всегда отрицательны и составляют от -2,2 до -3,5 м.д, что обычно даже несколько больше, чем в случае гликозилирования.

Однако даже сочетание трех вышеперечисленных методик далеко не всегда дает положительные результаты для высокопольной области спектра (ниже 57 м.д.), где находится большинство сигналов агликонных С-атомов. В таких случаях, в частности при установлении структуры новых агликонов, особенно эффективной оказалась двумерная гетероядерная корреляционная методика НМВС [25], основанная на наблюдении корреляций протонов с углеродами через несколько химических связей. В данной методике наиболее эффективно проявляются корреляции через 3 связи, особенно в случае *s-транс*-расположения Н- и С-атомов.

Обычно анализ спектра НМВС агликонной части начинают с однозначно идентифицируемого в относительно низкопольной области сигнала протона Н-3, у которого наблюдаются кросс-пики с атомами и группами кольца А: С-1, С-5, С-23 и С-24. Иногда наблюдается и кросс-пик через 2 связи с атомом С-4. Аналогично от С-3 прослеживаются корреляции с протонами у вышеперечисленных С-атомов. Далее от Н-5 или Н-1 прослеживаются кросс-пики с С-25, С-9 и с С-7 от Н-5, то есть атомами и группами кольца В. Аналогично проводятся отнесения для кросс-пигов между С- и Н-атомами других колец. Для проверки найденных решений делают "обратные" ходы и находят корреляции от протонов (или атомов углерода) метильных групп С-23-С-27, С-29 и С-30 или от низкопольных сигналов атомов С(Н)-12, С(Н)-13, С-28 и от С(Н)-атомов агликона с оксигруппами или от других групп, сигналы которых расположены в низкопольных областях. Для углеводных частей гликозидов методика НМВС позволяет в большинстве случаев определить или подтвердить типы гликозидных связей, поскольку обычно легко обнаруживаются кросс-пики через три связи между аномерным протоном Н-1 гликозилирующего моносахаридного остатка и соответствующим гликозилируемым С-атомом (и наоборот между аномерным С-атомом и соответствующим скелетным протоном у гликозилируемого С-атома).

По получаемой информации в отношении типов гликозидных связей применение методики НМВС к углеводной части в определенном смысле подобно методике ROESY и иногда может удачно дополнять ее при неоднозначностях интерпретации в том или ином случае. Однако сложности в отнесении кросс-пигов в большинстве случаев заставляют отдавать предпочтение методике ROESY. Следует отметить, что методика НМВС является чрезвычайно эффективной в установлении строения гликозидов и особенно их агликонных частей, поскольку позволяет получить информацию, не даваемую иными вышеописанными корреляционными методами.

Список литературы

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 320 с.
2. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / М.: Мир, 1986. – Т. 2. – 312 с.

3. Hostettmann K., Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
4. Saponins used in food and agriculture / Eds. G.R. Waller and K. Yamasaki. – New York: Plenum Press, 1996. – 441 p.
5. Saponins used in traditional and modern medicine / Eds. G.R. Waller and K. Yamasaki. – New York: Plenum Press, 1996. – 606 p.
6. Lacaille-Dubois M.A. Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants in: Immunomodulatory agents from plants / Ed. H. Wagner. – Basel: Birkhauser Verlag, 1999. – 215 p.
7. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 1978. – 656 с.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Rutaceae-Elaeagnaceae* / АН СССР. Бот. ин-т им. В.Л. Комарова. – Л.: Наука, 1988. – 357 с.
9. Perry L.M., Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia. – Cambridge: MIT Press, 1980. – 470 p.
10. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. – М.: Мир, 1980. – 621 с.
11. Lee T.M., Marderosian A.H. Two-dimensional TLC analysis of ginsenosides from root of dwarf ginseng (*Panax trifolius* L.), *Araliaceae* // J. Pharm. Sci. – 1981. – Vol. 70, № 1. – P. 89-91.
12. Гришкoveц В.И. Двумерная тонкослойная хроматография в анализе тритерпеновых гликозидов // Химия природ. соедин. – 2001. – № 1. – С. 53-55.
13. Гришкoveц В.И., Горбачева Л.А. Количественное определение содержания тритерпеновых гликозидов в плодах *Sophora japonica* // Химия природ. соедин. – 1996. – № 1. – С. 104-106.
14. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy // Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz. – 1973. – Vol. 80. – P. 704-710.
15. Domon B., Hostettmann K. New saponins from *Phytolacca dodecandra* L'HERIT. // Helv. Chim Acta. – 1984. – Vol. 67. – P. 1310-1315.
16. Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Зайков Г.Е. Образование и расщепление гликозидных связей. – М.: Наука, 1978. – 180 с.
17. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R.R., Wuthrich K. Improved spectral resolution COSY ¹H NMR spectra of proteins via double-quantum filtering // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1983. – Vol. 17. – P. 479-483.
18. Homans S.W., Dwek R.A., Fernandes D.L., Rademacher T.W. Multi-step relayed correlation spectroscopy: sequential resonance assignments in oligosaccharides // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1984. – Vol. 81. – P. 6286-6290.
19. Панов В.П., Жбанков Р.Г. Конформации сахаров // Конформационный анализ методом ЯМР. – Минск: Наука и техника, 1975. – С. 81-121.
20. Стодарт Дж. Стереохимия углеводов // Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Константы взаимодействия. – М.: Мир, 1975. – С. 177-187.
21. Kumar A., Ernst R.R., Wuthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the evolution of complete proton-proton cross relaxation networks in biological molecules // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – Vol. 95. – P. 1-12.
22. Bothner-By A.A., Stephens R.L., Lee J.T., Warren C.D., Jeanloz R.W. Structure determination of tetrasaccharide by transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame // J. Amer. Chem. Soc. – 1984. – Vol. 106, № 3. – P. 811-815.
23. Bodenhausen G., Freeman R. Correlation of protonated carbon-13 NMR spectra by heteronuclear two-dimensional spectroscopy // J. Magn. Reson. – 1977. – Vol. 28. – P. 471-475.
24. Bax A., Egan W., Kovac P. New NMR techniques for structure determination and resonance assignments of complex carbohydrates // J. Carbohydr. Chem. – 1984. – Vol 3. – P. 593-597.

25. Bax A., Summers M.F. ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple-quantum NMR // J. Amer. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 2093-2095.

**Triterpene glycosides of *Araliaceae*: methods of exudation
and establishment of structure**

Grishkovets V.I., Chirva V.Ya., Kachala V.V., Shashkov A.S.

The article summarized the results of author's works on methods of exudation and establishment of structure of triterpene glycosides of *Araliaceae*.

**ВЛИЯНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ РАЗЛИЧНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НА
НЕРВНУЮ СИСТЕМУ ЧЕЛОВЕКА**

А.М.ЯРОШ, доктор медицинских наук;

Я.А.КУЛИКОВА, О.Ф.ЮРКОВА, Л.И.КАМЕНЕК, Л.А.ШЕВКОПЛЯС, В.В.ТОНКОВЦЕВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Изучение влияния эфирных масел (ЭМ) растений на нервную систему человека имеет достаточно длительную историю [8, 9]. Определенные аспекты этого вопроса изучались при попытках использования ЭМ в клинике неврологических болезней [8, 9, 10] и для коррекции состояния операторов [1, 4]. Однако эти исследования не были систематическими и выполнялись в контексте работ другого направления. Поэтому в них даже не ставилась задача выявления зависимости действия ЭМ от их химического состава.

ЭМ лаванды настоящей (*Lavandula officinalis* L.), шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) и лимона (*Citrus limon* B.) – весьма популярны в ароматерапии [9, 10, 11]. Меньше применяется ЭМ полыни лимонной (*Artemisia balchanorum* Krasch.), куда входят цитраль (до 45%), линалоол, линалилацетат, гераниол и др. [11]. В составе ЭМ лаванды доминируют линалоол (до 33%), линалилацетат (32-53%) и лавандуол (до 15%). Присутствуют также в небольших количествах α -пинен, лимонен, 1,8-цинеол, борнеол, борнилацетат, камфара, нерол, гераниол, геранилацетат, α -терпинеол [3, 11]. В ЭМ шалфея мускатного также имеются линалилацетат и l-линалоол, а кроме того – оцимен, мирцен, цедрен, неролидол. В ЭМ лимона преобладает лимонен (до 90%), присутствует цитраль (2-6%), выявляются также геранилацетат, цитронеллол, γ -терпинеол, мирцен, сабинен и др. [3]. Таким образом, по доминирующим компонентам ЭМ лаванды и шалфея мускатного можно условно назвать линалоольным, лимона – лимонен-цитральным, полыни лимонной – цитраль-линалоольным.

В плане влияния на нервную систему ЭМ лаванды и шалфея мускатного характеризуются в литературе как успокаивающие, лимона и полыни лимонной – как тонизирующие, повышающие умственную работоспособность [8, 9, 11]. Однако, такая характеристика чрезмерно обобщена и не раскрывает зависимость от химического состава ЭМ.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей влияния ЭМ лаванды, шалфея мускатного, полыни лимонной и лимона на разные стороны функционирования нервной системы человека в связи с различием их химического состава.

Материалы и методы

Для характеристики влияния ЭМ на нервную систему человека оценивали изменения, происходящие в следующих функциональных блоках: психоэмоциональное состояние, умственная работоспособность и память, сенсомоторные процессы.

Исследование влияния ЭМ на психоэмоциональное состояние проводилось в двух вариантах. По первому варианту дыхание парами ЭМ лаванды, шалфея мускатного и лимона

производилось в течение 4-5 минут из портативного аромаингалятора без испарения ЭМ в атмосферу помещения. В качестве плацебо заполняли аромаингалятор водой.

По второму варианту испытуемые вдыхали в течение 20-25 минут испаряемые через ароматизатор в атмосферу помещения ЭМ лаванды, полыни лимонной, лимона. Конечная концентрация паров ЭМ в атмосфере 2 мг/м^3 [7]. Для более точной оценки зависимости влияния ЭМ лимона от химического состава в качестве референтного фактора был взят чистый лимонен в той же концентрации.

В случае дыхания парами всех ЭМ по первому варианту, а также парами ЭМ лаванды и полыни лимонной по второму, испытуемые сидели в креслах без напряжения. При изучении влияния ЭМ лимона по второму варианту они находились либо в состоянии напряженного учебного процесса (лекция), либо в физически более активном, но интеллектуально менее напряженном состоянии – на практическом занятии. Влияние лимонена также изучалось во время лекции.

Перед воздействием и в конце его проводилось тестирование психоэмоционального состояния испытуемых с помощью тестов «Самочувствие-Активность-Настроение» (САН) и Спилбергера, умственной работоспособности с помощью корректурной пробы в бланковом варианте. Влияние ЭМ на краткосрочную память оценивалось с помощью методики "Память на числа": до воздействия, сразу и через 1 ч после воздействия. Результаты психологических тестов расшифровывались по соответствующим правилам [5, 6].

Исследование влияния ЭМ лаванды и полыни лимонной на сенсомоторные реакции проводилось с помощью психофизиологического комплекса ПФК-01 по тестам "Тремор динамический" (измерение параметров физиологического тремора), "Простая сенсомоторная реакция" (ПСМР) и "Сложная сенсомоторная реакция" (ССМР). Перед тестированием обследуемые работали на комплексе 15-20 мин для исключения эффекта тренированности, затем проводили запись по программам тестирования. После этого проводился сеанс ароматизации длительностью 20 мин при концентрации паров ЭМ около $0,7 \text{ мг/м}^3$. Испытуемые контрольной группы находились 20 мин в этом же помещении, но воздействию эфирных масел не подвергались. Тестирование проводилось до, непосредственно после ароматизации и спустя один час.

Количество испытуемых, принявших участие в разных экспериментах, отражено в таблицах 1-13.

Оценка достоверности полученных результатов проводилась с использованием z-критерия знаков или критерия Вилкоксона для зависимых и критерия Манна-Уитни для независимых выборок и по t-критерию Стьюдента (при оценке достоверности относительных эффектов) [2].

Результаты и обсуждение

1. Влияние эфирных масел на психоэмоциональную сферу

Из таблиц 1 и 2 видно, что при кратковременном (4-5 мин) воздействии ЭМ лаванды оказало комплексное положительное влияние на психоэмоциональную сферу испытуемых, достоверно улучшив у них самочувствие и настроение, повысив их активность (суммарные значения показателей теста САН), уменьшив как ситуативную, так и личностную тревогу (тест Спилбергера). ЭМ шалфея мускатного также достоверно уменьшило ситуативную и личностную тревогу, но улучшило только самочувствие. ЭМ лимона несколько снизило лишь личностную тревогу. Плацебо не вызвало достоверных сдвигов ни по одному из изученных показателей.

В связи со слабым влиянием ЭМ лимона на психоэмоциональную сферу, с целью более полной его характеристики в этом плане изучено его действие при более длительной экспозиции в ситуациях напряженной умственной деятельности при физическом покое (лекция) и при умеренной умственной и физической активности (практическое занятие). В качестве референтного фактора использован практически чистый лимонен (табл. 3).

Таблица 1

Изменение суммарных показателей самочувствия, активности и настроения (тест САН) при кратковременном (4-5 минут) воздействии ЭМ лаванды, шалфея мускатного и лимона

Эфирное масло	n*	Самочувствие		Активность		Настроение	
		до	после	До	после	до	после
лаванда	20	4,27 ±0,24	4,98 ±0,24	4,87 ±0,25	5,50 ±0,21	4,65 ±0,26	5,10 ±0,30
p			<0,01		<0,05		<0,01
шалфей	17	4,42 ±0,26	4,73 ±0,21	4,71 ±0,27	5,00 ±0,19	4,59 ±0,21	5,00 ±0,17
p			<0,05				
лимон	22	4,80 ±0,18	5,03 ±0,18	5,42 ±0,17	5,59 ±0,20	5,59 ±0,16	5,73 ±0,17
плацебо	20	4,74 ±0,18	4,89 ±0,19	5,46 ±0,16	5,50 ±0,16	5,42 ±0,16	5,40 ±0,19

*Здесь и далее n – количество наблюдений, p - достоверность различий значений показателя до и после воздействия в группах.

Таблица 2

Изменение показателей ситуативной и личностной тревоги испытуемых (тест Спилбергера) при кратковременном (4-5 минут) воздействии ЭМ лаванды, шалфея мускатного и лимона

Эфирное масло	n	Ситуативная тревога		Личностная тревога	
		до	после	до	после
лаванда	20	35,1±1,6	30,8±1,0	36,2±1,4	31,7±1,1
p			<0,01		<0,01
шалфей	19	39,2±1,0	33,7±2,4	41,3±1,4	36,2±2,2
p			<0,01		<0,01
лимон	22	29,7±1,0	30,1±0,8	32,2±1,4	30,8±1,2
p					<0,05
плацебо	20	30,1±1,1	28,8±1,0	31,0±1,0	30,6±1,0

Таблица 3

Влияние ароматизации помещения ЭМ лимона и лимоненом на самочувствие по показателям теста САН

Тест САН	Лимонен, лекция (n=8)		Лимон, лекция (n=8)		Лимон, практика (n=7)	
	до	после	до	после	до	после
C1	4,88±0,52	4,75±0,36	5,62±0,42	4,88±0,64	4,43±0,30	5,57±0,48
p						<0,05
C2	4,38±0,38	4,38±0,42	5,25±0,37	4,62±0,56	4,28±0,28	6,00±0,44
p						<0,05
C3	5,38±0,50	4,50±0,46	5,88±0,48	4,38±0,53	4,29±0,42	5,28±0,52
p				<0,05		<0,05
C7	4,62±0,50	4,62±0,56	5,12±0,52	4,50±0,71	4,86±0,51	6,00±0,44
p						<0,1
Σ	4,76±0,40	4,52±0,42	5,36±0,38	4,55±0,52	4,70±0,37	5,76±0,31
p						<0,05

Как видно из таблицы 3, лимонен не вызвал изменений самочувствия испытуемых в ситуации повышенной умственной нагрузки. Под влиянием ЭМ лимона в той же ситуации отмечено снижение значения показателя по шкале С3 (разбитость-работоспособность). При умеренной физической нагрузке изменений было гораздо больше и они имели другую направленность: по шкалам С1 (плохо-хорошо), С2 (слабость-сила), С3 (разбитость-работоспособность) и по суммарному показателю самочувствия отмечено достоверное повышение значений, по шкале С7 (усталый-отдохнувший) – тенденция к повышению.

Аналогичные различия обнаружались и по шкале активности (табл. 4).

Таблица 4

Влияние ароматизации помещения ЭМ лимона и чистым лимоненом на активность по показателям теста САН

Тест САН	Лимонен, лекция (n=8)		Лимон, лекция (n=8)		Лимон, практика (n=7)	
	до	после	до	после	до	после
A4 P	4,88±0,35	4,25±0,45	5,00±0,33	4,12±0,52	4,14±0,70	4,71±0,71 <0,05
A5 P	5,38±0,42	4,50±0,46 <0,1	6,00±0,42	4,75±0,67	5,14±0,55	5,14±0,40
A7 P	4,50±0,38	4,38±0,46	5,00±0,46	4,50±0,71 <0,05	4,00±0,72	5,28±0,42
A8 P	4,88±0,44	4,12±0,55	4,88±0,55	4,38±0,75	4,14±0,77	5,28±0,42 <0,05
Σ P	4,81±0,33	4,39±0,39	5,36±0,38	4,48±0,63	4,27±0,58	4,88±0,44 <0,05

Лимонен при умственной нагрузке вызвал лишь тенденцию к снижению показателя активности испытуемых по шкалам А5 (безучастный-увлеченный), ЭМЛ – снижение показателя по шкале А7 (сонливый-бодрствующий). При физической нагрузке по шкалам А4 (бездеятельный-деятельный), А8 (желающий отдохнуть-желающий работать) и по суммарному показателю активности отмечено достоверное повышение показателей.

На показатели настроения (табл. 5) в ситуации повышенной умственной нагрузки и ограниченной физической лимонен не повлиял, а ЭМ лимона вызвало достоверное уменьшение значения по шкале Н8 (пессимистичный – оптимистичный) и тенденцию к уменьшению – по шкалам Н1 (грустный – веселый), Н3 (несчастный – счастливый), Н10 (недовольный – довольный). Напротив, на практическом занятии ЭМ лимона вызвало достоверное увеличение значений показателя по шкале Н4 (мрачный– жизнерадостный) и суммарного показателя настроения, а также тенденцию к увеличению – по шкале Н6 (печальный – радостный).

2. Влияние эфирных масел на умственную работоспособность

Как видно из таблицы 6, при однократном длительном (20 мин) воздействии паров ЭМ лаванды в концентрации 2 мг/м³ на испытуемых, находившихся в покое, наблюдается только увеличение показателя продуктивности работы.

Воздействие в том же формате ЭМ полыни лимонной (табл. 7) приводит к значительно более выраженному повышению умственной работоспособности испытуемых, что проявляется в достоверном увеличении числа просмотренных знаков, уменьшении количества ошибок, увеличении показателей точности и продуктивности работы.

Таблица 5

**Влияние ароматизации помещения ЭМ лимона и чистым лимоненом
на настроение по показателям теста САИ**

Тест САИ	Лимонен, лекция (n=8)		Лимон, лекция (n=8)		Лимон, практика (n=7)	
	до	после	до	после	до	после
Н1	5,12±0,55	4,38±0,42	5,75±0,31	4,75±0,59 <0,1	4,71±0,42	5,14±0,51
Н3	5,00±0,53	4,50±0,38	5,75±0,31	4,62±0,53 <0,1	5,00±0,69	6,00±0,31
Н4	5,12±0,52	4,62±0,38	5,88±0,30	4,88±0,52	4,57±0,65	5,86±0,46 <0,1
Н6	4,88±0,52	4,50±0,46	5,25±0,45	4,88±0,55	4,43±0,65	5,57±0,30 <0,1
Н8	5,38±0,53	4,50±0,46	6,00±0,42	4,75±0,53 <0,05	4,71±0,78	5,86±0,40
Н10	5,38±0,50	4,75±0,36	5,75±0,41	4,25±0,62 <0,1	5,00±0,72	5,86±0,34
Σ	5,09±0,46	4,54±0,38	5,66±0,32	4,75±0,54	4,77±0,59	5,79±0,30 <0,05

Таблица 6

**Изменение показателей корректурной пробы под влиянием эфирного
масла лаванды (n=22)**

Показатели корректурной пробы	До	После	До / после
S	390,3±30,4	417,0±28,3	93,6±2,4%
O	2,0±0,7	1,4±0,7	0,6±0,4
A	0,95±0,01	0,97±0,01	97,9±1,3%
E	382,5±20,5	402,7±21,2	95,0±2,2%
p			<0,05

Здесь и далее:

S – количество просмотренных знаков за 1 мин.;

O – количество допущенных ошибок;

A – интегральный показатель точности умственной работы;

E – интегральный показатель продуктивности умственной работы.

Данные о воздействии ЭМ лимона (табл. 8) дифференцированы по ситуации: лекция или практическое занятие.

Видно, что, в отличие от психоэмоциональной сферы, влияние ЭМ лимона на умственную работоспособность в обеих ситуациях однотипно и состоит в повышении темпа работы, ее продуктивности, производительности, а также комплексного показателя, отражающего продуктивность работы и устойчивость внимания.

Воздействие чистым лимоненом привело лишь к некоторому увеличению производительности работы (табл. 9).

Краткосрочная память в течение пребывания испытуемых в помещении (контрольная группа) практически не изменяется (табл. 10).

Таблица 7

Влияние ароматизации эфирным маслом полыни лимонной на показатели корректурной пробы (n=25)

Показатели корректурной пробы	До	После	До/после
S	355,1±15,5	381,1 ±16,0	93,2±2,7%
p			< 0,05
O	1,6±0,4	0,7± 0,2	0,90 ±0,4
p			< 0,05
A	0,95±0,01	0,97±0,01	97,3± 1,0%
p			< 0,05
E	338,9 ±15,6	370,9±15,2	91,4±2,7%
p			< 0,05

Таблица 8

Влияние ароматизации помещения ЭМ лимона на показатели корректурной пробы

Показатель	Лекция (n=9)		Практика (n=4)	
	до	после	до	после
Темп	1323±127	1604±122	1875±444	2451±261
p		<0,01		<0,05
Ошибка	0,78±0,28	0,78±0,32	1,25±1,25	0,50±0,50
Точность	0,999 ±0,001	1,000 ±0,001	1,000 ±0,001	1,000 ±0,001
Продуктивность	440,7±42,3	534,3±40,5	624,6±147,7	816,9±86,8
		<0,01		<0,05
Производительность	435,8±41,4	529,4±39,9	616,8±143,0	813,8±84,9
		<0,001		<0,05
Продуктивность и устойчивость	3,66±0,35	4,44±0,34	5,19±1,22	6,80±0,72
p		<0,01		<0,05

Таблица 9

Влияние ароматизации помещения чистым лимоненом на показатели корректурной пробы во время лекции (n=8)

Показатель	До	После
Темп	1186±84	1244±90
Ошибка	6,12±1,69	3,25±1,18
Точность	0,995±0,002	0,998±0,001
Продуктивность	393,2±28,0	413,4±29,9
Производительность	354,4±27,8	392,8±26,2
p		<0,05
Продуктивность + устойчивость	3,20±0,23	3,40±0,24

Воздействие ЭМ полыни лимонной приводит к увеличению количества запоминаемых цифр через 1 ч после процедуры в сравнении с исходным значением и к снижению числа ошибок как сразу после сеанса ароматизации, так и спустя 1 ч после него.

ЭМ лаванды действует в том же направлении, хотя несколько менее выражено.

3. Влияние эфирных масел на сенсомоторные процессы

Как видно из таблицы 11, пребывание в течение 20 мин в покое (контроль) достоверно уменьшает тремор. ЭМ полыни лимонной уменьшает тремор конечностей в сравнении с исходным значением и с контролем. ЭМ лаванды на динамический тремор не влияет (уменьшение в сравнении с исходным значением, но не с контролем).

Как видно из таблицы 12, отдых в помещении, где проводятся сеансы ароматерапии, на ПСМР не влияет. Через 1 ч после воздействия ЭМ лаванды ПСМР становится достоверно более быстрой, чем исходно, а также в сравнении с контролем и с состоянием сразу после сеанса ароматизации. При ароматизации ЭМ полыни лимонной не выявлено достоверных изменений ПСМР. В отношении ССМР, отдых в помещении приводит к уменьшению ее латентного времени (ЛВ) и к увеличению моторного времени (МВ). ЭМ лаванды увеличивает ЛВ ССМР, что особенно выражено через 1 ч после сеанса ароматизации, но тормозит увеличение моторного времени ССМР. ЭМ полыни лимонной уменьшает ЛВ ССМР, что более выражено через 1 ч после сеанса ароматизации, и, как и ЭМ лаванды, предотвращает увеличение МВ в конце сеанса ароматизации. По показателям теппинг-теста (табл. 13) в ситуации физического покоя и умственного напряжения чистый лимонен вызвал увеличение показателя силы нервной системы. ЭМ лимона в той же ситуации обусловило тенденции к повышению среднего темпа работы и интегрального показателя лабильности нервной системы, а также снижение показателя силы. В ситуации более высокой физической нагрузки и меньшей умственной ЭМ лимона и чистого лимонена не вызвали изменений.

Таблица 10

Влияние эфирного масла лаванды и полыни лимонной на выполнение методики "Память на числа"

Условия	Количество воспроизведенных чисел	Количество ошибок
Контроль (36 чел.)		
Исходно	7,84±0,64	3,37±0,58
Через 20 мин	8,16±0,49	3,48±0,45
Через 1 час	8,53±0,38	3,90±0,51
Полынь лимонная (25 чел.)		
Исходно	7,44±0,45	3,20±0,36
После ароматизации	8,33±0,52	1,80±0,26 Рк<0,01; P1<0,01
Через 1 час	9,22±0,37 P2<0,01	0,90±0,03 Рк<0,001; P1<0,01 P2<0,001; P3<0,001
Лаванда (22 чел.)		
Исходное	7,40±0,35	2,90±0,10
После ароматизации	7,60±0,30	2,40±0,15 Рк<0,05
Через 1 час	8,20±0,30 P2<0,1	1,13±0,10 Рк<0,01; P1<0,001; P2<0,001; P3<0,001

Рк - достоверность различий показателей в опытной и контрольной группах в соответствующие сроки; P1 - достоверность отличий от исходных значений показателей сразу после сеанса ароматизации (в контрольной группе через 20 мин); P2 - достоверность отличий от исходных значений показателей через 1 ч после сеанса ароматизации (в

контрольной группе - через 1 ч 20 мин пребывания в помещении); P3 - достоверность различий показателей сразу и через 1 ч после ароматизации

Выводы

1. Модальность и выраженность влияния ЭМ на нервную систему человека зависят как от его химического состава, так и от ситуации, в которой находится испытуемый.

2. ЭМ лаванды и шалфея мускатного, в составе которых преобладают линалоол и линалилацетат, положительно (улучшение самочувствия и настроения, повышение активности, снижение ситуативной и личностной тревоги) и выражено влияют на психоэмоциональную сферу. Влияние ЭМ лимона на психоэмоциональную сферу в условиях покоя выражено слабо, но проявляется в условиях умственной (преимущественно отрицательное) и физической (преимущественно положительное) нагрузки. Чистый лимонен в этом плане практически не активен.

3. Умственную работоспособность в большей мере повышают цитраль-содержащие ЭМ: лимон и полынь лимонная, преимущественно за счет ускорения работы. Влияние ЭМ лаванды на эту сторону деятельности центральной нервной системы намного слабее. Чистый лимонен и в этом плане практически не активен. Влияние ЭМ обоих типов на краткосрочную память невелико и состоит преимущественно в уменьшении числа ошибок.

4. Цитраль-содержащие ЭМ (лимон и полынь лимонная) стабилизируют и несколько ускоряют нейромоторные процессы. На сенсомоторные процессы ЭМ лаванды и полыни лимонной действуют по-разному: первое ускоряет преимущественно простую сенсомоторную реакцию, второе – сложную.

Таблица 11

Влияние эфирных масел полыни лимонной и лаванды на динамический тремор (количество касаний к стенкам траектории)

	Контрольная группа (36 чел.)	ЭМ полыни лимонной (25 чел.)	ЭМ лаванды (22 чел.)
Исходно	24,1±6,57	22,60±3,10	23,00±1,20
После процедуры	21,2±1,28 p ₁ >0,1	14,00±2,10 p ₁ <0,05 p _к <0,01	19,90±0,90 p ₁ <0,05 p _к >0,1

p₁ - достоверность различий между исходными показателями и показателями после воздействий или пребывания в помещении без воздействий; p_к - достоверность различий между опытом и контролем

Таблица 12

Влияние эфирных масел полыни лимонной и лаванды на показатели простой и сложной сенсомоторных реакций

Сроки исследования	ПСМР, сек	ССМР, латентное время, сек	ССМР, моторное время, сек
1	2	3	4
Контрольная группа (36 чел.)			
исходно	0,354 ± 0,060	0,766±0,030	0,309±0,027
через 20 мин.	0,374 ±0,070	0,666±0,030 P ₁ <0,05	0,390±0,028 P ₁ < 0,05
Через 1 ч	0,364± 0,020	0,616±0,025 P ₂ < 0,001	0,390±0,041
Лаванда (22 чел.)			
исходно	0,388±0,016	0,793±0,030	0,289±0,012
после сеанса	0,270±0,012 P ₁ <0,001	0,823±0,030 P _к <0,002	0,289±0,012 P _к <0,01

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
через 1 ч	0,189±0,014 P ₂ <0,001 P _K <0,001 P ₃ <0,001	0,893±0,030 P ₂ <0,05 P _K <0,001	0,321±0,016
Полынь лимонная (25 чел.)			
исходно	0,340±0,022	0,724±0,033	0,290±0,029
после сеанса	0,310±0,010	0,602±0,033	0,290± 0,019
через 1 ч	0,250±0,080	P ₁ <0,02 0,446±0,027 P ₂ <0,001 P _K <0,001 P ₃ <0,001	P _K <0,01 0,330±0,016

P₁, P₂ - достоверность отличий от исходных значений показателей, соответственно, сразу и через 1 ч после сеанса ароматизации (в контрольной группе – через 20 мин. и 1 ч 20 мин. пребывания в помещении); P_K - достоверность различий показателей в опытной и контрольной группах в соответствующие сроки; P₃ - достоверность различий показателей сразу и через 1 ч после ароматизации

Таблица 13

Влияние ароматизации помещения эфирным маслом лимона и чистым лимоненом на показатели теппинг-теста в зависимости от вида нагрузки

Показатель теппинг-теста	Лимонен, умственная нагрузка (n=7)		Лимон, умственная нагрузка (n=11)		Лимон, физическая нагрузка (n=7)	
	до	после	до	после	до	после
лабильность, баллы	6,00 ±0,47	5,67 ±0,41	6,00 ±1,11	6,43 ±0,68 p<0,1	6,50 ±0,96	6,00 ±0,52
показатель силы	4,68 ±0,13	4,93 ±0,03 p<0,01	5,06 ±0,02	4,88 ±0,03 p<0,05	4,74 ±0,09	4,56 ±0,23
средний темп	29,7 ±7,2	29,1 ±0,6	29,1 ±1,9	31,8 ±2,1 p<0,1	29,9 ±1,6	29,7 ±1,0

Список литературы

1. Кривенко В.В., Макачук Н.М., Подгурская Е.И. Фитонциды и психогигиена труда в авиации. // Химическое взаимодействие растений. – К.: Наукова думка, 1981. – С. 18-21.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Изд-во «Высшая школа», 1989. – 291 с.
3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. / Під ред. А.М. Гродзинського. – К.: Голов. ред. УРЕ, 1990. – 544 с.
4. Макачук Н.М., Кривенко В.В., Акимов Ю.А. и др. Изменение общей реактивности организма оператора в процессе трудовой деятельности под влиянием фитоионоаэрозоля // Фитонциды. Роль в биогеоценозах, значение для медицины: Мат. VIII совещания. – Киев: Наукова думка, 1987. – С. 189-192.
5. Основы психологии: Практикум / Ред.-сост. Л.Д.Столяренко. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2002. – 704 с.
6. Практикум по психологии / Под ред. А.Н.Леонтьева, Б.Гиппенрейтер. – Изд. Моск. ун-та, 1972. – 248 с.

7. Применение летучих растительных ароматических веществ в профилактических целях / Метод. рекомендации. – Ялта, 1996. – 14 с.
8. Солдатченко С.С., Пидаев А.В., Кащенко Г.Ф. Ароматерапия. Профилактика и лечение заболеваний эфирными маслами. – Симферополь: Таврида, 1999. – 207 с.
9. Уникальные свойства эфирных масел // Фітотерапія в Україні. – 2001. – № 1-2. – С. 42-44
10. Царев А.Ю., Бойко С.Д. Изменение психоэмоционального состояния больных дисциркуляторной атеросклеротической энцефалопатией под влиянием методов специальной психотерапии и ароматотерапии. //Актуальные вопросы курортологии, физиотерапии и медицинской реабилитации. Труды Крымского НИИ им. И.М.Сеченова, Том VIII. – Ялта, 1997. – С. 191-195.
11. Эфиромасличные и пряно-ароматические растения /Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.

Different chemical compound of essential oils and its influence on nervous system in human
Yarosh A.M., Kulikova Y.A., Yurkova O.F., Kamenek L.I., Shevkoplyas L.A., Tonkovtseva V.V.

The essential oils that contained high concentration of linalool and linalilacetate influence favorably in psycho-emotional sphere. Cytrale-containing essential oils increase the information speed processing in healthy people. The lemon essential oil inhalation have improved the psycho-emotional level especially in condition of moderate physical activity.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM FRUITING BODIES AND MYCELIA OF MEDICINAL MUSHROOM *LENTINUS EDODES* (BERK.) SING.

V. G. BABITSKAYA¹;
 N. A. BISHKO²;
 N. YU. MITROPOLSKAYA²

¹Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Byelorussia
²M.G.Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

Lentinus edodes (Berk.)Sing. has excellent nutritional value and medicinal qualities [6, 10]. The shiitake mushroom is used as dietary supplements in the form of tablets, extracts etc. [14]. The bioactive polysaccharides of *L.edodes* or polysaccharides-protein complexes is applicated as biological response modifiers for inhibiting tumor growth and other potent therapeutic uses [11].

The aim of our work was comparative analysis of the mycelia and fruiting bodies chemical composition of different shiitake strains.

Materials and methods

4 strains of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. were obtained from the culture collection of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Byelorussia, Minsk and Institute of Botany of the National Academy of Ukraine, Kiev.

Mycelium of these strains was grown in submerged conditions on the glucose-peptone nutrient medium, (g/l): glucose - 10, peptone - 3, K₂HPO₄ - 1, KH₂PO₄ - 1, MgSO₄• 7H₂O - 0.25, corn extract - 20 ml, deionized water - 1000 ml, pH 5.5.

After preparation the medium was sterilized by autoclaving for 20 min at 121°C. Mycelia were grown in 5-l flasks on the orbital shaker. Seed culture for 5 l flasks was developed in 0.5-l flasks containing 0.05l of cultivation medium inoculated with homogenized mycelia from Petri dishes. The biomass was ready to harvest after 7 days of cultivation at 28°C.

Mycelia of *L. edodes* strains were separated from medium by filtration. Mycelium was washed off with distilled water, dried to at 60°C, and pounded.

Fruiting bodies of *L. edodes* were grown on mixture of oak sawdust with wheat bran (4:1) [2]. Fruiting bodies of *L. edodes* were harvested, dried at 60°C and pounded.

The content of true protein in fruiting bodies and mycelia of *L. edodes* was estimated according to Lowry's method [9], chitin-glucan complex according to Kurshner and Ganek's method [12]. Lipids were extracted according to Folch's method [4]. The content of amino acids was estimated on amino acid analyzer AAA-881 "Microtechna" [8] fatty acids - on gas-liquid chromatograph "Chrom-5" with 15% polyethylenglycol succinate as liquid (temperature of column is 160°C, temperature of evaporation - 210°C) [7, 13[2]]. Exo- and endopolysaccharides were determined in the cultured liquid, mycelia and fruiting bodies of *L. edodes* [3, 5].

Results and discussion

Analysis of data given in Table 1 showed that the mycelia of the studied strains of *L. edodes* slightly differ one from other by main indexes of the chemical composition. However, the content of the true protein and lipids in the mycelia was higher than in fruiting bodies on 17-53% and on 95-96% accordingly for all strains. It should be noted that fruiting bodies of *L. edodes* contained greater quantity of chitin-glucan complex and phenolic substances.

Table 1

The chemical composition of *Lentinus edodes* strains

Strain	Bio-mass, g/l	Lipids, % a.d.m.	True protein, % a.d.m.	Complex of chitin-glucans, % a.d.m.	Polysaccharides		Phenolic substances, mg %
					Endopoly-saccharides, % a.d.m.	Exopoly-saccharides, g/l	
101 m	5.7	7.5	20.0	7.6	3.2	3.5	1660
182 m	8.0	9.0	23.0	6.0	3.5	4.3	1800
182 f	-	0.3	11.0	11.0	3.2	-	2100
185 m	7.8	8.7	23.0	5.8	3.2	3.4	1630
185 f	-	0.5	19.1	10.2	3.0	-	1920
192 m	6.2	6.9	22.5	7.4	2.8	2.4	1500

m – mycelia

f – fruiting bodies

Earlier it has been demonstrated, that the content of phenolic substances in fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* was also higher but the content of lipids - lower in comparison with mycelia too [1].

It should be noted that the high differences between the mycelia and fruiting bodies of *L. edodes* strains were related with the content of the complex of the chitin-glucan substances – the fruiting bodies contained them almost 2 times higher compared to the mycelia.

The protein composition of the mycelia of studied strains included 17 amino acids (Table 2). The greatest content was characterized for aspartic and glutamic acids. Difference in content of some individual amino acids between *L. edodes* strains was considerable. For example, the content of lysine of strain 101 was on 65% greater than in strain 182, histidine - three times, methionine – two times, tyrosine – 4.4 times (Table 2). The fruiting bodies and mycelia of strain 185 differed on the content of some aminoacids: the fruiting bodies contained the greater quantities of lysine, histidine, argenine, threonine, methionine, tyrosine, and the mycelium – the higher quantities of aspartic acid, glycine, alanine, cystine, leucine, isoleucine (Table 2).

Table 2

**The content of amino acids in proteins of *Lentinus edodes* strains
(% of true protein)**

Constituent	Strain 101, mycelia	Strain 182, mycelia	Strain 185		Strain 192, mycelia
			mycelia	fruiting bodies	
lysine	2.1	4.9	2.0	6.0	2.5
histidine	1.0	1.2	1.2	3.0	0.8
arginine	8.5	4.2	4.1	9.6	4.7
aspartic acid	10.7	10.0	9.9	7.0	11.5
threonine	6.3	4.5	4.8	7.2	5.8
serine	6.3	5.9	5.6	5.7	6.3
glutamic acid	17.6	17.0	22.9	20.0	18.3
proline	5.2	5.0	5.4	5.5	5.7
glycine	6.0	5.2	5.3	3.4	6.1
alanine	7.0	6.1	6.6	4.7	8.1
cystine	3.4	3.2	3.2	2.0	2.5
valine	6.5	6.9	6.4	6.9	6.5
methionine	1.2	2.2	1.2	2.4	1.2
isoleucine	4.3	5.2	5.0	3.3	4.2
leucine	9.3	10.0	8.4	5.1	7.5
tyrosine	1.4	4.5	4.0	6.2	4.0
phenylalanine	3.2	4.0	4.0	3.7	4.3

The data obtained indicated that the lipids of mycelia of all strains of *L. edodes* consist of 10 fatty acids (Table 3). The highest content was characterized for linoleic (C_{16:0}) and palmitic (C_{18:2}) acids. Unlike from the mycelium of *P. ostreatus*, grown on the same medium, the mycelia of *L. edodes* had in their composition myristic (C_{14:0}), palmitoleic (C_{16:1}) and heptadecenoic (C_{17:1}) acids [1]. It was found that palmitoleic (C_{16:1}) and heptadecenoic (C_{17:1}) were absent in the fruiting bodies of *L. edodes* as compared with the mycelium of the same strain (table 3). In contrast to *P. ostreatus*, mycelia of *L. edodes* have the higher content of unsaturated fatty acids than fruiting bodies [1].

Table 3

**The content of fatty acids in the lipids of *Lentinus edodes* strains
(% of total lipids)**

	101 m	182 m	185 m	185 f	192 m
C _{14:0}	0.90	0.73	0.66	1.20	0.92
C _{15:0}	1.37	1.58	1.32	1.40	2.12
C _{16:0}	18.99	21.53	19.72	28.20	22.08
C _{16:1}	2.05	0.85	0.88	-	0.82
C _{17:0}	0.74	0.45	0.55	-	0.54
C _{17:1}	0.49	0.45	0.88	traces	0.74
C _{18:0}	3.27	2.30	2.74	7.30	4.00
C _{18:1}	8.98	3.79	7.07	6.30	5.66
C _{18:2}	61.12	67.42	66.18	54.30	62.47
C _{18:3}	2.08	0.90	traces	1.40	0.64
Saturated fatty acids	25.28	26.59	24.99	38.10	29.67
Unsaturated fatty acids	74.72	73.41	75.01	61.90	70.33
Ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids	1.40	1.43	1.41	1.60	1.34

m – mycelia; f – fruiting bodies

We analyzed the carbohydrate composition in polysaccharides of the mycelia and fruiting bodies of *L. edodes* strains. It has been demonstrated that glucose is the main carbohydrate component as in the mycelia as in the fruiting bodies (table 4). The arabinosa was absented in the mycelia and was discovered in the trace quantities in the fruiting bodies of the all strains, with the exception of strain 185 (Table 4).

Table 4

The content of carbohydrates in polysacchrides of *Lentinus edodes* strains, % of total

Carbo- hydrate	Strain 101			Strain 182		
	Mycelia		Fruiting bodies	Mycelia		Fruiting bodies
	Endopoly- saccharides	Exopoly- saccharides		Endopoly- saccharides	Exopoly- saccharides	
arabinose	-	-	traces	-	-	traces
xylose	1.02	1.36	traces	traces	traces	-
mannose	8.16	-	5.50	10.25	16.82	4.78
galactose	8.38	traces	6.80	16.42	traces	4.82
glucose	82.44	98.64	87.70	73.33	89.18	90.40
	Strain 185			Strain 192		
arabinose	-	-	2.40	-	-	traces
xylose	2.15	traces	traces	2.00	1.5	-
mannose	10.65	16.20	6.87	10.60	14.20	6.20
galactose	12.69	3.44	6.64	10.80	traces	5.60
glucose	74.51	80.36	84.09	76.60	84.30	88.20

“ - “ - is absent

At the same time xylosa was estimated in the polysaccharide composition of mycelia, and was absented or presented in trace quantities in fruiting bodies. Exopolysaccharides differed from endopolysaccharides in the main on the small or trace quantities of the galactose in the carbohydrate composition.

References

1. Babitskay V.G., Bisko N.A., Scherba V.V., Mitropolskaya N.Yu., Puchkova T.A. Some biologically active substances from Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.)Kumm.(*Agaricomycetidae*) // Intl. J. of Medicinal Mushrooms. – 1999. – Vol. 1, N 4. – P. 345-349.
2. Bisko N.A., Bilay V.T. Some physiological aspects of the cultivation of *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. // Mushroom biology and mushroom products. Proc. 2-nd Intern.Congr. Pensivania, July 9-12, 1996. – P. 381-386.
3. Chorlin A.J. The method of carbohydrate determination. - Moscow: Mir, 1975. – 122 p.
4. Folch I., Lees M., Sloan-Staulet G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.// J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 491-509.
5. Grushenko M.M., Anakienko T.S., Reznikov B.M. The use of phenolsulphur acid and toluidin methods of carbohydrate determination as the method of studing of carbohydrate composition of lignocarbohydrate complex / Lignincarbohydrate complexes of the wood. – Riga: Zinantre, 1978. – P. 32-35.
6. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. - Santa Cruz: CA: Botanica Press, 1995. – 251 p.
7. Keits M. Methods of lipid analysis. – Moscow: Mir, 1975. – 322 p.
8. Krischenko V.P. Methods of the estimation of plant production quality. – Moscow: Kolos, 1983. – 112 p.
9. Lowry O.M., Kosenbrough N.I., Far A.L., Rondaler J.I. Protein measurment with the Folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. – 1950. – Vol. 193 – P. 265-275.

10. Mizuno T. Food function and medicinal effects of mushrooms fungi // Foods Food Inged J. (Japan) – 1993. – Vol. 158. – P. 55-70.
11. Ooi V.E.C., Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides.// Intl. J. of Medicinal Mushrooms. - 1999. – Vol.1, N 3. – P. 195-206.
12. Peterburgskij A.V. Methods of agrochemical analysis. – Moscow: Kolos, 1968. – 496 p.
13. Vereschagin A.G., Scvorcov S.V., Ishakov N.I. The composition of threeglycerids of cotton oil // Biochemistry. 1963. – Vol. 5. – P. 868-878.
14. Wasser S.P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S. And Timor-Tismenetsky M. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations // Intl. J. of Medicinal Mushrooms. - 2000. - Vol. 2, N 2. – P. 1-20.
15. Zaprometov M.N. The phenolic components of plants: Biosynthesis, transformation, function. – Moscow: Nauka, 1985. – 143 p.

**Biologically active substances from fruiting bodies and mycelia of medicinal mushroom
Lentinus edodes (Berk.) Sing.**

Babitskaya V. G., Bisko N. A., Mitropolskaya N. Yu

True protein, phenols, exo- and endopolysaccharides, amino acid and fatty acid content and composition of fruiting bodies and mycelia of 4 strains of medicinal edible mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. were investigated. It has been estimated that the content of the true protein and lipids in the mycelia was higher, than in fruiting bodies, but the fruiting bodies contained greater quantity of chitin-glucan complex and phenolic substances. It has been demonstrated that the content of unsaturated fatty acids in mycelia was higher than in fruiting bodies.

РЕФЕРАТЫ

УДК 634.14:577.19

Ежов В.Н. Итоги и перспективы биохимических исследований в Никитском ботаническом саду - Национальном научном центре // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 5-8.

Приводится история развития биохимии растений в Никитском ботаническом саду, вклад ученых НБС-ННЦ в развитие отечественной науки, перспективы дальнейших биохимических исследований.

Библ. 25.

УДК 635.9:582.675.1:57.085.2

Митрофанова И.В., Соколов О.И., Ежов В.Н. Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (*Clematis* sp.) // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 9-20

Представлены результаты регенерации растений через прямой соматический эмбриогенез клематиса. Установлено влияние питательной среды, концентрации фитогормонов, интенсивности освещения и температуры на индукцию образования соматических зародышей и их дальнейшее развитие.

Ил. 6. Табл. 4. Библ. 43.

УДК 634.6:581.19:631.527

Рихтер А.А., Синько Л.Т. Сопряженность биохимических признаков плодов субтропических растений – зизифус, гранат и их использование в селекции // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 20-27.

Рассмотрена взаимосвязь биохимических признаков в плодах зизифуса и граната. Показано, что селекция растений зизифуса на повышенное содержание сухих веществ в плодах приведет к увеличению их сахаристости ($r = 0,44-0,73^{**}$) и Р-витаминной активности ($r = 0,53^{**}-0,66^{**}$ (0,05)). Отбор форм с повышенным содержанием титруемых органических кислот будет сочетаться с обогащением их пектинами ($r = 0,45-0,66^{**}$) и уменьшением сахарокислотного индекса ($r = -0,78^{**} - -0,92^{**}$). Селекция растений граната на повышенную сахаристость сока плодов положительно связана с накоплением моносахаридов ($r = 0,87^{**}-0,96^{**}$), сахарозоры ($r = 0,30-0,97^{**}$) и отношением сахаров к кислотам ($r = 0,31-0,64^{**}$). Обогащение плодов аскорбиновой кислотой прямо коррелирует с накоплением титруемых органических кислот ($r = 0,22-0,75^{**}$), но приведет к снижению сахарокислотного показателя ($r = -0,12 - -0,77^{**}$). Увеличение титруемой кислотности сока плодов обусловит снижение сахарокислотного индекса ($r = -0,84^{**} - -0,90^{**}$) и может обусловить увеличение содержания антоцианов ($r = 0,34^{*}-0,62^{**}$).

Табл. 3. Библ. 17.

УДК 634.2:632.38:57.085.2

Лукичёва Л.А., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Оздоровление сортов вишни (*Prunus cerasus* L.) и сливы (*Prunus domestica* L.) от вирусов с использованием биотехнологических приемов // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 27-34.

Рекомендованы биотехнологические приемы оздоровления растений вишни и сливы от вирусов (PDV, PNRSV, PPV) на основе комплексного применения методов термо-, хемотерапии *in vitro* и культуры органов и тканей.

Ил. 4. Табл. 3. Библ. 21.

УДК 634.14:577.19

Ежов В.Н., Полонская А.К., Комар-Темная Л.Д., Волошина И.В., Виноградов Б.А. Биологически активные вещества хеномелеса (*Chaenomeles* Lindl.) в связи с перспективами его промышленного выращивания // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 35-49.

Дана сравнительная характеристика 16 сортообразцов хеномелеса по накоплению в плодах сахаров, аскорбиновой кислоты, фенольных веществ, соотношению двух форм фенольных веществ – флавонолов и катехинов. Установлен состав и содержание химических веществ в листьях хеномелеса. Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицировано свыше 80 химических веществ в составе плодов хеномелеса и 22 летучих компонента эфирного масла кожицы плодов. Дана физико-химическая характеристика жирного масла из семян хеномелеса, установлен жирно-кислотный состав. По комплексу помологических и биохимических признаков выделено 6 сортообразцов хеномелеса, перспективных для дальнейшего испытания.

Ил. 7. Табл. 17. Библ. 27.

УДК 635.918:57.085.2

Митрофанова И.В., Соколова М.К., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Челомбит С.В. Биотехнологическая система получения растений каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) через соматический эмбриогенез и органогенез // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 50-60.

На основе соматического эмбриогенеза и органогенеза каладиума разработана биотехнологическая система получения растений. Исследовано влияние кинетина и БАП на индукцию формирования соматических зародышей и адвентивных почек каладиума. Представлены условия адаптации *in vivo* растений.

Ил. 14. Табл. 6. Библ. 17.

УДК 677.164.3: 58.085

Карпов П.А. Культура органов и тканей представителей рода *Yucca* L. // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 61-74.

Подобраны условия и питательные среды для культивирования изолированных семян и зародышей, клонального микроразмножения, ризогенеза, каллусогенеза и реализации различных программ морфогенеза в культурах *Yucca aloifolia* и *Y. torreyi*. Дан обзор литературы по вопросу культивирования растений рода *Yucca in vitro*. На основании данных литературы и экспериментальных исследований составлена общая схема клонального микроразмножения представителей рода *Yucca* L.

Ил. 7. Табл. 3. Библ. 42.

УДК 582.736.3:577.19

Палий А.Е., Ежов В.Н. К вопросу о составе и биологической активности вторичных метаболитов *Melilotoides cretacea* (M. Vieb.) Sojak гликозидов // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 74-84.

Исследованы биологически активные вещества *Melilotoides cretacea* (M. Vieb.) Sojak. Установлено, что во всех частях растения присутствуют тритерпеновые гликозиды. Максимальное количество тритерпенов накапливается в корнях растения в период цветения. Выявлено 19 веществ тритерпеновой природы, среди которых идентифицирована олеаноловая кислота. В стеблях и листьях обнаружены фенольные кислоты и рутин, а в цветках – флавоноиды. Из семи присутствующих в растении флавоноидов идентифицированы пять: кверцетин, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-7-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкозил-рамнозид (рутин), кверцетин-3-О-глюкозил-глюкозид.

Выявлено, что тритерпеноиды *M. cretacea* обладают различными видами биологической активности: антибактериальной активностью относительно грампозитивных

и грамотрицательных бактерий и ростигибирующей (негативно влияют на прорастание семян и рост корней проростков тест-объектов).

Показано, что *Melilotoides cretacea* можно считать перспективным источником кверцетина, гликозидов кверцетина и тритерпенов с высокой биологической активностью.

Ил. 5. Табл. 4. Библ. 25.

УДК 633.822:57.085.23

Бугара А.М., Бугара И.А. Морфогенез и клональное микроразмножение мяты в культуре листовых и стеблевых эксплантов *in vitro* // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 85-97.

Исследованы особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* молодых листьев и стеблевых сегментов мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Двухукосная, Украинская перечная и Прилуцкая 6. Разработана экспериментальная система множественной регенерации для клонального микроразмножения изучаемых сортов, обеспечивающая коэффициент размножения 1:14-1:31 в зависимости от генотипа и типа экспланта.

Ил. 10. Библ. 24.

УДК 547.918:543.422:582.5/9

Гришковец В.И., Чирва В.Я., Качала В.В., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: методы выделения и установления структуры // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 97-107.

В статье обобщены результаты работ ее авторов по исследованию структур тритерпеновых гликозидов аралиевых. Отмечены как новые тритерпеновые гликозиды, так и впервые обнаруженные авторами в растениях семейства аралиевых.

Ил. 1. Библ. 25.

УДК 547.913:634.334:331.103.2:599.89

Ярош А.М., Куликова Я.А., Юркова О.Ф., Каменек Л.И., Шевкопляс Л.А., Тонковцева В.В. Влияние эфирных масел различного химического состава на нервную систему человека // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Том 127. – С. 107-116.

Эфирные масла, содержащие высокие концентрации линалоола и линалилацетата благоприятно влияют на психоэмоциональное состояние.

Цитраль-содержащие эфирные масла повышают скорость обработки информации в корректурной пробе. Психоэмоциональное состояние при вдыхании паров эфирного масла лимона улучшается при наличии двигательной активности.

Табл. 13. Библ. 11.

УДК 579.22.582.28

Бабицкая В.Г., Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю. Биологически активные компоненты из плодовых тел и мицелия лекарственного гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 116-120.

Были изучены содержание белка, фенолов, экзо- и эндополисахаридов, состав аминокислот и жирных кислот в плодовых телах и мицелии 4 штаммов лекарственного съедобного гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Было определено, что в мицелии содержание белка и липидов выше, чем в плодовых телах, а плодовые тела содержат большее количество веществ хитин-глюканового комплекса и фенолов. Продемонстрировано, что содержание ненасыщенных жирных кислот в мицелии выше, чем в плодовых телах.

Табл. 4. Библ. 15

СОДЕРЖАНИЕ

Ежов В.Н. Итоги и перспективы биохимических исследований в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре	5
Митрофанова И.В., Соколов О.И., Ежов В.Н. Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (<i>Clematis</i> sp.)	9
Рихтер А.А., Синько Л.Т. Сопряженность биохимических показателей плодов субтропических растений – зизифус, гранат и их использование в селекции	20
Лукичева Л.А., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Оздоровление сортов вишни (<i>Prunus cerasus</i> L.) и сливы (<i>Prunus domestica</i> L.) от вирусов с использованием биотехнологических приемов	27
Ежов В.Н., Полонская А.К., Комар-Темная Л.Д., Волошина И.В., Виноградов Б.А. Биологически активные вещества хеномелеса (<i>Chaenomeles</i> Lindl.) в связи с перспективами его промышленного выращивания	35
Митрофанова И.В., Соколова М.К., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Челомбит С.В. Биотехнологическая система получения растений каладиума (<i>Caladium hortulanum</i> Birdsey.) через соматический эмбриогенез и органогенез	50
Карпов П.А. Культура органов и тканей представителей рода <i>Yucca</i> L.	61
Палий А.Е., Ежов В.Н. К вопросу о составе и биологической активности вторичных метаболитов <i>Melilotoides cretacea</i> (M. Vieb.) Sojak	74
Бугара А.М., Бугара И.А. Морфогенез и клональное микроразмножение мяты в культуре листовых и стеблевых эксплантов <i>in vitro</i>	85
Гришковец В.И., Чирва В.Я., Качала В.В., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: методы выделения и установления структуры	97
Ярош А.М., Куликова Я.А., Юркова О.Ф., Каменек Л.И., Кузнецова Л.А., Шевкопляс Л.А., Гонковцева В.В. Влияние эфирных масел различного химического состава на нервную систему человека	107
Babitskaya V. G., Bisko N. A., Mitropolskaya N. Yu. Biologically active substances from fruiting bodies and mycelia of medicinal mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.	116
Рефераты	121

CONTENTS

Ezhov V.N. Results and perspectives of biochemical researches in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center	5
Mitrofanova I.V., Sokolov O.I., Yezhov V.N. Indirect somatic embryogenesis of <i>Clematis</i> sp.	9
Richter A.A., Sinko L.T. Biochemical characters of subtropical fruits - zhizhiphus, pomogranate and their use in selection	20
Lukichyeva L.A., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Biotechnological methods of cleaning up cultivars of cherry (<i>Prunus cerasus</i> L.) and plum (<i>Prunus domestica</i> L.)	27
Ezhov V.N., Polonskaya A.K., Komar-Tyomnaya L.D., Voloshina I.V., Vinogradov B.A. Biologically-active substances of <i>Chaenomeles</i> Lindl. in connection with prospects of its industrial cultivation	35
Mitrofanova I.V., Sokolova M.K., Mitrofanova O.V., Ivanova N.N., Chelombit S.V. Biotechnological system of caladium (<i>Caladium hortulanum</i> Birdsey.) plants obtaining via somatic embryogenesis and organogenesis	50
Karpov P.A. Tissue and organ culture of <i>Yucca</i> L.	61
Paliy A.E., Yezhov B.N. To the question about composition and biological activity of several secondary metabolites of <i>Melilotoides cretacea</i> (M. Bieb.) Sojak.	74
A. M. Bugara, I. A. Bugara. Morphogenesis and clonal micropropagation in leaves and stems explants of mint <i>in vitro</i>	85
Grishkovets V.I., Chirva V.Ya., Kachala V.V., Shashkov A.S. Triterpene glycosides of <i>Araliaceae</i> : methods of exudation and establishment of structure	97
Yarosh A.M., Kulikova Y.A., Yurkova O.F., Kamenek L.I., Shevkoplyas L.A., Tonkovtseva V.V. Different chemical compound of essential oils and its influence on nervous system in human	107
Babitskaya V. G., Bisko N. A., Mitropolskaya N. Yu. Biologically active substances from fruiting bodies and mycelia of medicinal mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.	116
Summaries	121