

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ИРИСА СИБИРСКОГО (*IRIS SIBIRICA* L.) МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

© Л.И. Тихомирова^{1*}, Н.Г. Базарнова¹, Т.Н. Ильичева², Ю.Ц. Мартиросян^{3,4}, И.В. Афанасенкова⁵

¹Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, (Россия)

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127422, (Россия)

⁴Институт биохимической физики РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, (Россия)

⁵Восточно-Казахстанский государственный университет им. С. Аманжолова, ул. Казахстан, 55, Усть-Каменогорск, 070004 (Казахстан)

Методы биотехнологии позволяют получить качественное лекарственное растительное сырье в короткие сроки, в большом количестве не уничтожая природные запасы. Такие биотехнологические подходы, как аэропонные технологии, имеют потенциал для крупномасштабного выращивания растений ириса и производства вторичных метаболитов. Микрклональное размножение дает возможность получить здоровый посадочный материал в необходимом количестве, независимо от времени года. Сочетание этих двух технологических подходов позволит разработать биотехнологию круглогодичного производства лекарственного растительного сырья ириса сибирского.

В результате исследования определено необходимое содержание 6-бензиламинопурина в питательных средах на этапе собственно микроразмножения для формирования наибольшего количества адвентивных побегов оптимальной длины. Необходимым содержанием БАП для *I. sibirica* являлось 2.5–5.0 мкМ. Введение в питательные среды цитокининов совместно с ауксинами, L- глютамином и аденин сульфатом 100 мг/л, а также чередование низких и высоких концентраций цитокинина усиливало регенерационный эффект БАП. При круглогодичном выращивании растений-регенерантов в условиях аэропоники количество биомассы растительного сырья *I. sibirica* по данному способу составляло примерно 31.2 кг/м² по сырой массе за один год.

Установлено, что интактные растения и растения-регенеранты *I. sibirica*, полученные на основе разработанной биотехнологии имели идентичный групповой состав биологически активных веществ. Выявлено, что сумма флавоноидов в листьях аэропонных растений ириса превышала содержание в листьях интактных растений в 3 раза, а содержание эфирного масла в растениях-регенерантах и в аэропонных листьях сорта Стерх выше на 26% в сравнении с листьями интактных растений. Водные и спиртовые экстракты *I. sibirica* проявляли противовирусную активность в отношении вируса герпеса. При невысокой токсичности экстракты интактных растений, и растений-регенерантов имели относительно высокий индекс селективности.

Тихомирова Людмила Ивановна – кандидат биологических наук, заведующая отделом биотехнологии растений ЮСБС АлтГУ, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Базарнова Наталья Григорьевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой органической химии, декан химического факультета, e-mail: bazarnova@chemwood.asu.ru

Ильичева Татьяна Николаевна – доктор биологических наук, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Мартиросян Юрий Цатурович – руководитель группы аэропонных технологий выращивания растений, кандидат биологических наук, e-mail: yumart@yandex.ru

Афанасенкова Ирина Владимировна – доцент кафедры химии, кандидат педагогических наук, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Ключевые слова: *I. sibirica* L., лекарственные растения, культура ткани, вторичные метаболиты, растения-регенеранты, аэропонные технологии.

Введение

В 2017 г. мировой рынок лекарственных трав был оценен в 72.7 млрд долларов США и, как ожидается, будет демонстрировать прибыльный рост в течение прогнозируемого периода в среднем на 14.88% до достижения 7.0 трлн долларов США к 2050 г. Это увеличение объясняется растущим предпочтением потребителей к лекарствам на растительной основе, которые не вызывают токсично-

* Автор, с которым следует вести переписку.

сти при передозировке и имеют меньше побочных эффектов. Для российского рынка в настоящее время характерна тенденция к росту, однако объем и его доля в общем объеме рынка фармпрепаратов на сегодняшний день выглядят довольно скромно, составляя 11–12 млн долларов США, или 0.5–1.5% от мирового уровня. При этом Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО) при ООН ежегодно публикует безвозвратные потери видов растений, в том числе лекарственных, в связи с варварскими методами заготовки [1, 2].

Методы биотехнологии позволяют получить качественное лекарственное растительное сырье в короткие сроки, в большом количестве не уничтожая природные запасы. С использованием методов суспензионной культуры и «бородатых» корней (hairy roots) разработан ряд технологий, позволяющих получить ценные продукты вторичного метаболизма растений, такие как гликозиды, алкалоиды и некоторые другие биологически активные вещества. Тем не менее, согласно заключению экспертов, на сегодняшний день на практике не в полной мере реализованы данные методы, так как существует проблема поддержания стабильных линий культуры, а недостатком большинства биореакторов остается их дороговизна и сложность [3–5].

Ирисы – перспективные лекарственные и декоративные многолетние растения [6–10]. К.Ф. Блиновой и ее коллегами [11, 12] выделены ксантоновые гликозиды у *Iris ensata* Thunb. Определено содержание ксантонового гликозида мангиферина (антиоксидант, иммуномодулятор и в составе противовирусных препаратов) у некоторых растений родов *Iris*, в том числе у *Iris lactea* Pall., *Iris ensata*, *Iris reichenbachii* Neuffel., *Iris sibirica* [13–18]. Мангиферин является основным компонентом препарата Алпизарин, выпускаемого в России, – противовирусного средства для лечения инфекции, вызванной вирусом герпеса [19, 20].

Такие биотехнологические подходы, как аэропонные технологии, имеют потенциал для крупномасштабного выращивания растений ириса и производства вторичных метаболитов. Микроклональное размножение дает возможность получить здоровый посадочный материал в необходимом количестве, независимо от времени года. Сочетание этих двух технологических подходов позволит разработать биотехнологию круглогодичного производства лекарственного растительного сырья ириса сибирского.

Экспериментальная часть

Растительный материал. В качестве объектов исследования использовали растения-регенеранты, гидропонные и интактные растения *I. sibirica*. Интактные 6 летние растения заготавливали в окрестностях г. Новоалтайска Алтайского края в 2015 г. Сырье сушили до воздушно-сухого состояния, упаковывали в полиэтиленовые мешки и хранили в эксикаторе.

Методика исследования. В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы [21, 22]. Цветки *I. sibirica* брали в фазе бутонизации, когда они плотно закрыты листочками обертки, и в условиях ламинарбокса проводили стерилизацию. Части трубки околоцветника и цветоножки делили на фрагменты размером не более 3×3 мм и помещали на питательные среды.

Для клонального микроразмножения питательные среды готовили по прописи MS [23], содержащие 30 г/л сахарозы. На этапе введения в культуру добавляли 3 мкМ НУК (α -нафтилуксусной кислоты) в сочетании с 8 мкМ БАП (6-бензиламинопурином). На этапе собственно микроразмножения питательные среды готовили с добавлением 2.5–10.0 мкМ БАП (№98 – 2.5; №100 – 5.0; №117 – 7.5; №137 – 10.0). Среда с ауксинами (А) 1 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК (3-индолилмасляная кислота) имели следующий гормональный состав: №127 – 2.5 БАП+А; №3 – 5.0 БАП+А; №129 – 7.5 БАП+А; №130 – 10.0 БАП+А. А также в среду вводили L-глутамин и аденин сульфата в количестве 100 мг/л (L-гл. и ад. с. 100 мг/л). Для укоренения *I. sibirica* использовали среду, содержащую 3 мкМ НУК. pH среды доводили до 5.8–5.9 и добавляли 0.6% агара. Среда разливали в пластиковые контейнеры (по 30 мл в каждый) или в культуральные флаконы (по 10 мл в каждый). Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин при 120 °С. Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота при 24–26 °С.

Перевод растений-регенерантов в условия ex vitro. Условия выращивания и характеристика аэропонной установки. В работе была использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Ю.Ц. Мартиросян). Установка построена по принципу модульности и может быть использована для научно-исследовательских работ по селекции картофеля, а также для размножения и выращивания других сельскохозяйственных и лекарственных растений.

Модуль установки состоит из трех ярусов, на каждом ярусе одновременно можно высадить и вырастить от 72 (для относительных крупномеров) до 144 растений (всего 426 растений ириса), технологическая площадь 0,98 м², освещенность 15 кЛк, потребляемая мощность 1 кВт.

Выращивание растений на аэропонной установке проводили в культивационном помещении, оборудованном контрольным климатическим блоком. Водообеспечение и минеральное питание растений осуществлялось путем периодического впрыскивания питательного раствора (под давлением 3 атм.), орошающего корневую систему растений. В паузах между подачей раствора происходила аэрация корней.

Система обеспечена автоматическим управлением технологического процесса подачи питательного раствора, режимов аэрации корневой системы, длительности и цикличности светового периода, поддержания необходимой температуры и влажности в культивационном помещении.

Необходимым условием работы аэропонной установки являлся постоянный воздухообмен: минимальное значение составляет 5000 куб.м./час. Оптимальная температура роста ириса 24–26 °С. Относительная влажность должна составлять 65–80±5%.

Сушка и измельчение растительного сырья. Перед сушкой растительное сырье сортировали и очищали от инородных примесей и сгнивших частей. Для сушки растительное сырье, в соответствии с рекомендациями Р.А. Музычкиной [24], сразу же после сбора рассыпали тонким слоем. Хорошо высушенное лекарственное сырье содержало гигроскопической влаги не более 12–15%. Воздушно-сухие образцы листьев и корневищ перемалывали до размера частиц 2–4 мм. Подготовленные таким образом образцы анализировали на содержание влаги, золы, целлюлозы и лигнина по стандартным методикам [25, 26].

Экстрагирование растительного сырья. За основу фитохимического исследования была принята схема, описанная В.М. Косман с коллегами [27]. Экстрактивные вещества извлекали из растительного сырья путем последовательной обработки образцов различными растворителями: гексаном, этиловым спиртом нисходящей концентрации (96 и 40%), водой и 1% раствором гидроксида натрия. Экстракцию гексаном и спиртовыми растворами проводили в аппарате Сокслета, обработкой образцов в соотношении сырье – экстрагент 1 : 50. Обработку водой и 1% раствором щелочи проводили выдерживанием образцов в растворе при температуре 50–70 °С, при соотношении сырье – экстрагент 1:50.

Определение содержания некоторых групп биологически активных веществ. Для количественного определения содержания флавоноидов в экстрактах использована методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс с раствором AlCl₃. В качестве экстрагента использовался спирт этиловый 90%, содержащий 10% раствор серной кислоты. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре UV-Vis Cary 60 при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор полученного извлечения в 95% этиловом спирте. Расчет суммы флавоноидов проводили в пересчете на кверцетин. Содержание кумаринов и тритерпеновых гликозидов также определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 272 и 360 нм соответственно. Количественное определение дубильных веществ проводили путем окисления перманганатом калия в присутствии индигокармина [24].

Количественное определение эфирного масла абсолютом. Процесс экстракции растворителями проходил в несколько последовательных стадий. В качестве растворителя использовался петролейный эфир (40–70 °С). На выходе получается ценный ароматерапевтический и парфюмерный продукт, называемый абсолютом [28].

Все измерения проведены не менее чем в трехкратной повторности. Все расчеты по содержанию различных веществ приведены на абсолютно сухую массу.

Анализ противовирусной активности экстрактов I. sibirica в отношении вируса герпеса. Оценку противовирусной активности проводили в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» по методу измерения поглощения клетками прижизненного красителя – нейтрального красного (НК) [29]. Для оценки противовирусной активности использовали экстракты, извлеченные этанолом (96%), водой. Противовирусную активность тестировали в культуре почки зеленой мартышки после образования 90–95% монослоя в 96-луночных планшетах. Питательную среду удаляли, вносили вирус простого герпеса 1 типа в дозе 100 ТЦИД₅₀/мл в объеме 50 мкл. Адсорбцию вируса проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 50–60 мин. По окончании инкубации вирус удаляли и вносили поддерживающую среду (среда MEM, 1% FBS, 50 мкг/мл гентамицин, все Gibco) в объеме 200 мкл/луночку. По истечении 48 ч проводили оценку противовирусной активности препаратов в тесте адсорбции нейтрального красного. Далее измеряли оптическую плотность содержимого лунок на микропланшетном ридере BioRad 680 при длине волны 490 нм с использованием программы Земфира 2.0.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили в MS Excel 2007 с использованием стандартных показателей [30, 31]. В вариантах опыта по введению в культуру, собственно микроразмножению, укоренению и адаптации растений-регенерантов объем выборки $n = 20$, число повторностей трехкратное. Достоверность результатов (P) оценивалась с применением t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверным при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждения

Биотехнологии получения сырья. В зависимости от целей у ириса возможно использование различных типов эксплантов: почек вегетативного побега, фрагментов цветка, зародышей. При микроразмножении ириса использование в качестве эксплантов почек вегетативного побега экономически не целесообразно. Влияние внутренней инфекции на коэффициент размножения наблюдается на протяжении всего времени культивирования. Введение в питательные среды антибиотиков и фунгицидов приводит к получению стерильной культуры, но проявляется отрицательное действие данных препаратов. Только в исключительных случаях следует использовать почки вегетативных побегов в качестве эксплантов. Для размножения дикорастущих видов необходимо использовать фрагменты цветка и зиготические зародыши. Для размножения отборных форм и сортов – фрагменты цветка, так как семенами сорта ириса не размножаются [32].

Одной из основных проблем при микроразмножении является поддержание длительно пассируемой культуры. Для культуры ириса на этапе собственно микроразмножения необходимо чередовать среды с высоким содержанием цитокинина и низким. При этом в питательные среды с низким содержанием фитогормона следует добавить L-гл. и ад. с. 100 мг/л. На среды укоренения следует высаживать побеги только после пассирования на средах с низким содержанием цитокинина, дополненных негормональными стимуляторами роста, а часть побегов необходимо переносить на среды с высоким содержанием цитокинина для дальнейшего размножения. Благодаря такой схеме культивирования можно длительное время поддерживать стерильную культуру сортов основе *Iris sibirica* (табл. 1, рис. 1).

Получение растительного сырья I. sibirica в условиях аэропоники. Средняя масса высаживаемого в аэропонику растения-регенеранта составляла 0,4 г. На площади 0,98 м² выращивали 432 растений, по 3 растения на одно посадочное место. Через три месяца выращивания средняя масса одного растения составляла примерно 18,0±1,5 г, соответственно, прирост 432 растений был равен 7776 г. При круглогодичном выращивании количество биомассы растительного сырья *I. sibirica* по данному способу составляло примерно 31,2 кг/м² по сырой массе за один год (рис. 2).

Таблица 1. Состав питательных сред и схема культивирования *I. sibirica* сорт King of King

№ опыта	Вариант опыта	№ среды, (БАП, мкМ)	Этап микроразмножения		Этап укоренения		
			число побегов	высота растения, мм	высота растения, мм	число корней	длина корней, мм
1	контроль	93(1.0)	1,5±0,1	67,0±8,6 истончен.	86,6±8,6	3,2±0,3	17,1±1,6
2	2/1	98(2.5)	1,8±0,2	69,5±3,7	101,6±9,4	6,8±0,3*	14,8±1,1
	2/2	127(2.5+A)	1,2±0,1	65,0±7,1	101,3±2,9	7,0±1,1*	13,3±0,8*
	2/3	98→78	1,5±0,1	58,1±4,3	78,0±2,4	12,3±0,8*	14,3±0,7
	2/4	127→78	2,0±0,3*	78,0±6,3	93,6±3,4	6,8±0,9*	18,4±0,6
3	3/1	100(5.0)	2,0±0,7*	53,3±3,5	113,6±4,8*	5,3±1,0	9,2±1,0*
	3/2	3(5.0+A)	1,2±0,1	65,9±5,1	63,5±1,1*	7,0±1,1*	9,5±0,7*
	3/3	100→78	1,8±0,3	63,6±6,04	103,5±0,8	9,0±0,6*	12,2±0,7*
	3/4	3→78	1,7±0,04	58,0±2,7	77,6±4,1	7,2±0,5*	19,4±0,6
4	4/1	117(7.5)	1,2±0,1	51,9±3,2	60,0±4,6*	6,6±0,2*	11,7±0,8*
	4/2	129(7.5+A)	1,2±0,2	52,2±3,0	84,0±7,2	4,0±0,2*	10,1±0,8*
	4/3	117→78	2,0±0,3*	61,6±4,1	107,5±1,6*	6,3±0,3*	19,8±0,7
	4/4	129→78	1,7±0,2	62,6±6,2	87,9±7,2	6,7±0,8*	15,2±0,9
5	5/1	137(10.0)	1,0±0,2	49,2±4,3	94,6±5,9	4,2±0,5	12,0±0,7*
	5/2	130(10.0+A)	1,1±0,3	67,5±5,1	76,0±5,2	3,33±0,9	7,8±0,5*
	5/3	137→78	1,5±0,1	60,5±0,3	81,8±3,4	6,4±1,0*	13,4±0,9
	5/4	130→78	1,7±0,4	84,0±6,9	83,3±1,4	7,3±0,8*	11,4±0,6*
среднее			1,5	62,8	87,9	6,4	13,48

Примечание. + A – 1,0 мкМ НУК+0,1 мкМ ИМК; Питательная среда 78 – MS +1 мкМ БАП+L-гл. и а. с. 100 мг/л;

* различия с контролем достоверны при $P \leq 0,05$.



Рис. 1. Растения-регенеранты *I. sibirica* на этапе собственно микроразмножения

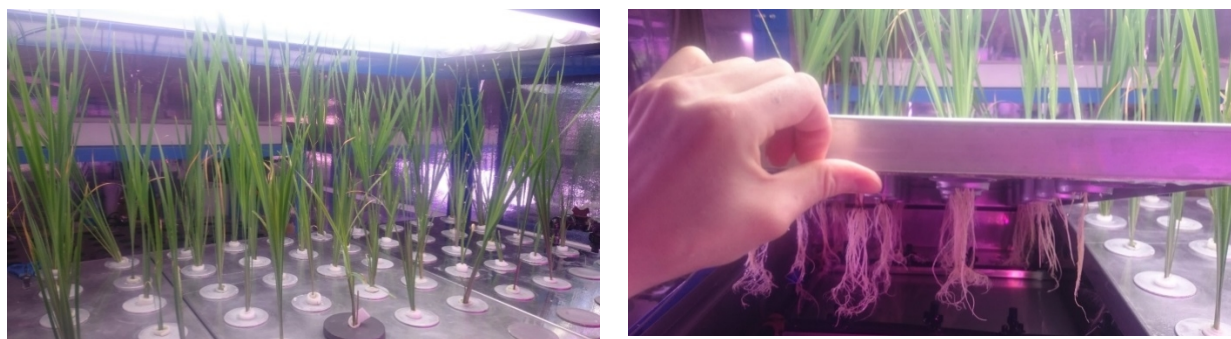


Рис. 2. Получение растительного сырья *I. sibirica* в условиях аэропоники

Фитохимический анализ полученного сырья. Воздушно-сухие образцы биотехнологического сырья анализировали на содержание золы, влаги и высокомолекулярных компонентов в сравнении с листьями и корневищами с корнями интактных растений. Содержание золы в растениях-регенерантах Стерха составляло 7.7%, что соответствует содержанию в листьях интактных растений. В гидропонных листьях Стерха зольность превышала в 2 раза этот показатель у интактных растений (табл. 2, 3).

Максимальный выход экстрактивных веществ определяли в растительной биомассе растений-регенерантов Cambridge и Стерха – 21.6 и 19.6% соответственно, а также у гидропонных растений Стерха – 32.0%. Так, суммарное содержание экстрактивных веществ в гидропонных листьях *I. sibirica* сорта Стерх в 1.77 раза больше, чем в традиционном (табл. 4, 5).

Определено количественное содержание эфирного масла абсолют у растений-регенерантов Cambridge и Стерха, а также в разные сроки сбора интактного сырья (весна, осень). Максимальное содержание эфирного масла отмечено в листьях Cambridge весенней вегетации – 1.63% и растений-регенерантов Cambridge – 1.12%. Содержание эфирного масла в растениях-регенерантах и в гидропонных листьях Стерха мало отличается от количества эфирных масел, накопленных в корневищах с корнями интактных растений, но выше на 26% в сравнении с листьями интактных растений (рис. 3).

Таблица 2. Структурные компоненты растительного сырья *I. sibirica* сорт Cambridge разного способа получения, % на а.с.в

Компоненты	Биотехнологическое сырье Растения-регенеранты	Традиционное сырье			
		листья		корневища с корнями	
		весна	осень	весна	осень
Влажность	5.5±0.5	4.56±0.5	5.42±0.5	5.32±0.5	5.9±0.5
Зольность	7.6±0.1	11.4±0.1	8.2±0.1	16.2±0.2	13.6±0.2
Целлюлоза	18.1±0.9	20.4±0.9	23.4±0.8	24.4±1.1	27.4±0.9
Лигнин	23.1±0.7	20.6±0.4	19.0±0.6	28.8±0.5	26.6±0.6

Таблица 3. Структурные компоненты растительного сырья *I. sibirica* сорта Стерх разного способа получения, % на а.с.в.

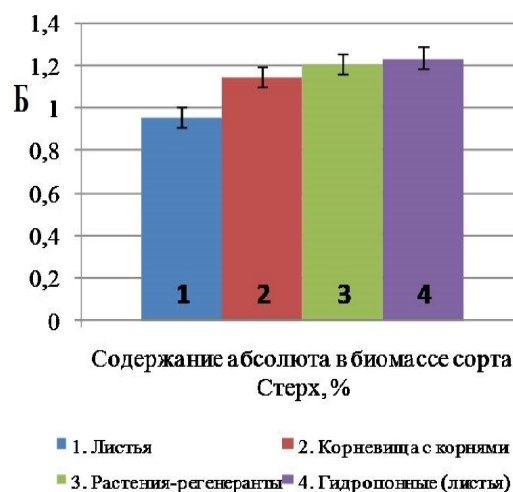
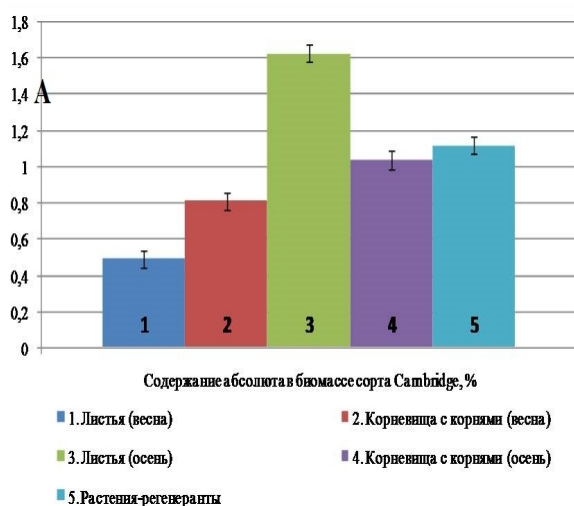
Компоненты	Биотехнологическое сырье		Традиционное сырье	
	Растения-регенеранты	гидропонные (листья)	листья	корневища с корнями
Влажность	4.1±0.5	4.8±0.5	4.7±0.5	4.9±0.5
Зольность	7.7±0.1	13.6±0.3	7.6±0.2	4.9±0.2
Целлюлоза	18.7±0.8	27.8±0.5	27.9±0.6	29.1±0.7
Лигнин	21.2±0.6	12.2±0.5	21.8±0.5	24.4±0.6

Таблица 4. Количественное содержание экстрактивных веществ в растительном сырье *I. sibirica* сорта Cambridge разного способа получения, % на а.с.в.

Растворитель	Биотехнологическое сырье		Традиционное сырье			
	Растения-регенеранты		листья		корневища с корнями	
			весна	осень	весна	осень
Гексан	5.7		2.9	1.5	2.0	1.8
Хлороформ	2.3		1.2	1.1	1.0	1.0
95 % этанол	4.7		7.5	5.6	3.0	1.9
Дистиллированная вода	8.9		6.0	5.8	13.8	11.5
Общее содержание	21.6		17.6	14.0	19.8	16.2

Таблица 5. Количественное содержание экстрактивных веществ в растительном сырье *I. sibirica* сорта Стерх разного способа получения, % на а.с.в.

Растворитель	Биотехнологическое сырье		Традиционное сырье	
	Растения-регенеранты	гидропонные (листья)	листья	корневища с корнями
Гексан	4.2	4.8	6.0	1.4
Хлороформ	4.2	3.00	2.8	2.4
95 % этанол	6.1	13.8	4.1	3.8
Дистиллированная вода	5.3	10.4	5.1	4.2
Общее содержание	19.6	32.0	18.0	11.8

Рис. 3. Содержание эфирного масла абсолют в растительной биомассе веществ *I. sibirica*. А. Cambridge; Б. Стерх

Количественное содержание биологически активных веществ (БАВ) является одним из основных показателей качества лекарственного сырья [33]. Нами выявлено значительное содержание флавоноидов в листьях гидропонных растений. В связи с этим биотехнологическое сырье *I. sibirica* может быть естественным источником этих веществ для человека (табл. 6, 7).

Показана способность биотехнологического сырья *I. sibirica* к накоплению разнообразных макро- и микроэлементов. Содержание тяжелых и токсичных металлов не превышало допустимый уровень для лекарственного растительного сырья [34].

Определение противовирусной активности экстрактов, полученных из биотехнологического сырья. При исследовании состава водных и водно-спиртовых экстрактов *I. sibirica* сорт Cambridge выявлено, что наименьшей токсичностью обладали водные экстракты растений-регенерантов и из корневищ с корнями весеннего сбора (CD_{50} равен разведениям 1/2 и 1/40 соответственно). Все исследованные экстракты проявили противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса. Наибольшей активностью обладал спиртовой (95%) экстракт корневищ с корнями весеннего сбора, ED_{50} равен разведению 1/3840, индекс селективности равен 64. Перспективным представляется также водный экстракт листьев осеннего сбора, индекс селективности равен 24 (табл. 8). Проанализированные водные экстракты, полученные из сырья сорта Стерх, являются нетоксичными и обладают противовирусными свойствами. Наиболее сильное ингибирующее действие проявляет водный экстракт растений-регенерантов (табл. 9).

Таблица 6. Количественное содержание групп биологически активных веществ *I. sibirica* сорт Cambridge, % на а.с.в.

БАВ	Биотехнологическое сырье		Традиционное сырье			
	растения-регенеранты		листья		корневища с корнями	
			весна	осень	весна	осень
Флавоноиды	5.64±0.09		5.74±0.06	5.03±0.07	4.89±0.08	4.54±0.06
Дубильные вещества	2.82±0.06		2.96±0.29	2.47±0.04	3.52±0.07	3.49±0.05
Кумарины	1.37±0.06		0.93±0.07	2.05±0.08	1.64±0.06	3.59±0.08
Тритерпеновые гликозиды	0.73±0.05		0.90±0.05	0.88±0.06	0.46±0.04	0.42±0.04

Таблица 7. Количественное содержание групп биологически активных веществ *I. sibirica* сорт Стерх, % на а.с.в.

БАВ	Биотехнологическое сырье		Традиционное сырье	
	растения-регенеранты	гидропонные (листья)	листья	корневища с корнями
Флавоноиды	5.75±0.08	12.80±0.09	4.87±0.05	2.32±0.07
Дубильные вещества	1.80±0.05	2.41±0.08	2.69±0.07	3.62±0.07
Кумарины	0.96±0.07	0.10±0.05	0.82±0.06	0.40±0.04
Тритерпеновые гликозиды	0.83±0.05	2.34±0.06	1.79±0.07	3.04±0.06

Таблица 8. Токсичность и противовирусная активность экстрактов растительного сырья *I. sibirica* сорт Cambridge

Исследуемое сырье	Время сбора	Растворитель	Токсичность, (CD_{50}), мкг/мл	Противовирусная активность (ED_{50}), мкг/мл	Индекс селективности (IS)
Корневища с корнями	весна	95% этанол	500	7,8	64
Корневища с корнями	весна	вода	3450	431	8
Листья	весна	вода	375	94	4
Листья	осень	вода	725	30	24
Растения-регенеранты		вода	44500	2781	16

Таблица 9. Токсичность и противовирусная активность водных экстрактов растительного сырья *I. sibirica* сорт Стерх

Исследуемое сырье	Токсичность (CD_{50}), мкг/мл	Эффективность (ED_{50}), мкг/мл	Терапевтический индекс (IS)
Листья	25100	3188	8
Корневища с корнями	21000	2625	8
Растения-регенеранты	25150	1645	16
Гидропонные листья	52000	6500	8

Заключение

Для формирования наибольшего количества адвентивных побегов оптимальной длины на этапе собственноразмножения необходимым содержанием БАП в питательной среде для *I. sibirica* являлось 2.5–5.0 мкМ. Введение в питательные среды цитокининов совместно с ауксинами, L- глютамином и аденин

сульфатом 100 мг/л, а также чередование низких и высоких концентраций цитокинина усиливало регенерационный эффект БАП.

При круглогодичном выращивании растений-регенерантов в условиях аэропоники количество биомассы растительного сырья *I. sibirica* по данному способу составляло примерно 31.2 кг/м² по сырой массе за один год.

Установлено, что интактные растения и растения-регенеранты *I. sibirica*, полученные на основе разработанной биотехнологии, имели идентичный групповой состав биологически активных веществ. Выявлено, что сумма флавоноидов в листьях гидропонных растений ириса превышала содержание в листьях интактных растений в 3 раза, а содержание эфирного масла в растениях-регенерантах и в гидропонных листьях сорта Стерх мало выше на 26% в сравнении с листьями интактных растений.

Водные и спиртовые экстракты *I. sibirica* проявляли противовирусную активность в отношении вируса герпеса. При невысокой токсичности и интактные растения, и растения-регенеранты имели относительно высокий индекс селективности. Данные, полученные для интактных растений и растений регенерантов сопоставимы: все показатели отличаются не более чем в 2 раза, что не превышает ошибку метода.

Список литературы

1. Medicinal Plants Industry 2017. URL: <http://tejasiblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
3. Roberts S.C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture // Nat. Chem. Biol. 2007. Vol. 3. Pp. 387–395. DOI: 10.1038/nchembio.2007.8.
4. Xu J.X., Ge X., Dolan M.C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures // Biotechnol. Adv. 2011. Vol. 29. Pp. 278–299. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.002.
5. Xu J.X., Zhang W., Cao X., Xue S. Abietane diterpenoids synthesized by suspension-cultured cells of *Cephalotaxus fortune* // Phytochem. Lett. 2011. Vol. 4. Pp. 52–55. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.12.003.
6. Асланянц Л.К., Маршавина З.В. Об эфирном масле, синтезируемом культурой ткани ириса *Iris sibirica* // Прикладная биохимия и микробиология. 1979. Т. 15. С. 769–774.
7. Асланянц Л.К., Маршавина З.В., Казарян А.Г. Продуктивность культуры клеток *Iris sibirica* L., выращенных на упрощенной питательной среде // Растительные ресурсы. 1988. Т. 24. С. 107–110.
8. Багдасарова З.М., Асланянц Л.К., Узунян Л.В. Био конверсия терпеноидов культурой клеток ириса (*Iris sibirica*) // Прикладная биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. С. 774–778.
9. Kaššák P. Screening of the chemical content of several Limniris group Irises // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. №3. Pp. 11–14.
10. Седельникова Л.Л., Кукушкина Т.А. Содержание запасных и биологически активных веществ в вегетативных органах *Iris sibirica* L. (*Iridaceae*) // Ученые записки ЗабГУ. 2016. Т. 11, №1. С. 123–128.
11. Блинова К.Ф., Калюпанова Н.И. Ксантоновые гликозиды *Iris ensata* // Химия природных соединений. 1974. №4. С. 535.
12. Блинова К.Ф., Глызин В.И., Пряхина Н.И. С-гликозид из *Iris ensata* // Химия природных соединений. 1977. №1. С. 535.
13. Денисова О.А., Глызин В.И., Патудин А.В., Гавриленко Б.Д. Определение содержания ксантонового гликозида мангиферина у некоторых растений родов *Iris*, *Gentiana*, *Hedysarum* // Химико-фармацевтический журнал. 1980. Т. 14. С. 76–77.
14. Jiang D.J., Dai Z., Li Y.J. Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents // Cardiovascular Drug Rev. 2004. Vol. 22, N2. Pp. 91–102. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2004.tb00133.x.
15. Pinto M.M.M., Sousa M.E., Nascimento M.S.J. Xanthone derivatives: new insight in biological activities // Current Med Chem. 2005. Vol. 12. Pp. 2517–2538. 10.13181/mji.v22i3.586.
16. Fotie J., Bohle, D.S. Pharmacological and biological activities of xanthenes // Antiinfective agents in medicinal chemistry. 2006. Vol. 5. Pp. 15–31. DOI: 10.2174/187152106774755563.
17. Ковалёв В.Н., Михайленко О.А. Исаев Д.И. Гурбанов Г.М. Количественное определение мангиферина в корневищах *Iris hungarica* и *Iris sibirica* методом ВЭЖХ // Azərbaycan əsəçiliq və farmakoterapiya jurnalı. 2016. №1. С. 13–17.
18. Јевремовић С., Крстић-Милошевић Д., De Carlo A., Benelli K., Lambardi M., Антонић Д., Трифуновић М., Момчилов., Лојић М., Суботић А. Култура ткива и криопрезервација као методе за повећање продукције мангиферина код балканске перунике (*Iris reichenbachii* Heuffel.) // Зборник радова III Симпозијума биолога и еколога Републике Српске. СБЕРС. 2015. Vol. 1. Pp. 41–53. DOI: 10.7251/SKP1607041J.
19. Minina S.A., Abu-Skhela G.R.I., Astakhova T.V., Pryakhina N.I., Zenkevich I.G., Kosman V.M. Technology of dry extract production from the above-ground part of milk-white iris herbs (*Iris lactea* Pall.) // Pharm. Chem. J. 1999. Vol. 33, N4. Pp. 211–213. DOI: 10.1007/BF02509942.

20. Minina S.A., Astakhova T.V., Pryakhina N.I., Abu-Skela G. Selecting the optimum composition and developing the technology for tablets of milk-white iris extract // Pharm. Chem. J. 2001. Vol. 35, N2. Pp. 85–87. DOI: 10.1023/A:1010472921542.
21. Бугенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964. 272 с.
22. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. 488 с.
23. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N4. Pp. 473–497.
24. Музычкина Р.А. Технология производства и анализ фитопрепаратов. Алматы, 2011. 360 с.
25. ГОСТ 24027.2-80. Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла. М., 1981. 10 с.
26. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учебное пособие. М., 1991. 320 с.
27. Косман В.М., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Накопление биологически активных веществ в подземных частях лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в зависимости от срока культивирования // Химия растительного сырья. 2013. №2. С. 139–146. DOI: 10.14258/jcprm.1302139.
28. Зюков Д.Г. Андреевич Е.Н., Чипига А.П. Технология и оборудование эфирномасличного производства. М., 1979. 190 с.
29. Finter N.B. Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays // J. Gen. Virol. 1969. N5. Pp. 419–427. DOI: 10.1099/0022-1317-5-3-419.
30. Доспехов Б.Д. Методика полевого опыта. М., 1979. 416 с.
31. Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. М., 1990. 296 с.
32. Тихомирова Л.И. Биотехнологические аспекты размножения *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Биотехнология. 2013. №2. С. 74–78.
33. Государственная фармакопея РФ. XIII изд. М., 2015. URL: www.femb.ru/feml.
34. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Халявин И.А. Элементный состав *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2017. №2. С. 119–126. DOI: 10.14258/jcprm.2017021517.

Поступила в редакцию 23 марта 2018 г.

После переработки 9 сентября 2018 г.

Принята к публикации 9 сентября 2018 г.

Для цитирования: Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц., Афанасенкова И.В. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris Sibirica* L.) Методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.

Tikhomirova L.I.^{1*}, Bazarnova N.G.¹, Ilicheva T.N.^{2,3}, Martirosian Iu.Ts.⁴, Afanasenkova I.V.⁵ OBTAINING PLANT MATERIALS SIBERIAN IRIS (*IRIS SIBIRICA* L.) BY METHODS OF BIOTECHNOLOGY

¹Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 (Russia)

³All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st., 42, Moscow, 127422 (Russia)

⁵East Kazakhstan State University named after S. Amanzholov, ul. Kazakhstan, 55, Ust-Kamenogorsk, 070004 (Kazakhstan)

Methods of biotechnology allow to obtain high-quality medicinal plant raw materials in a short time, in large quantities without destroying natural reserves. Biotechnological approaches such as aeroponic technologies have the potential for large-scale cultivation of iris plants and production of secondary metabolites. Microclonal reproduction makes it possible to obtain a healthy planting material in the required amount, regardless of the time of year. The combination of these two technological approaches will allow to develop biotechnology of year-round production of medicinal plant raw materials of Siberian iris.

The study determined the content of 6-benzylaminopurine on the stage actually micropropagation for the formation of the greatest number of adventitious shoots of optimal length. The required content of BAP in the nutrient medium for *I. sibirica* was 2.5–5.0 µM. The introduction of cytokinins in the nutrient medium together with auxins, L-glutamine and adenine sulfate 100 mg/l, as well as the alternation of low and high concentrations of cytokinin enhanced the regenerative effect of BAP. With year-round cultivation of regenerative plants in aeroponic conditions, the amount of biomass of plant raw materials *I. sibirica* for this method was about 31.2 kg / m² of crude weight in one year.

It is established that intact plants and regenerative plants *I. sibirica*, obtained on the basis of the developed biotechnology, had identical group composition of biologically active substances. It is revealed that the sum of flavonoids in the leaves of hydroponic iris plants exceeded the content in the leaves of intact plants by 3 times, and the content of essential oil in regenerate plants and hydroponic leaves of the Sterch variety but higher by 26% compared with the leaves of intact plants.

Aqueous and alcoholic extracts of *I. sibirica* showed antiviral activity against herpes virus. With low toxicity, both intact plants and regenerative plants had a relatively high selectivity index.

Keywords: *I. sibirica* L., medicinal plants, tissue culture, secondary metabolites, and plant-regenerants have aeroponic technology.

References

1. Medicinal Plants Industry 2017. URL: <http://tejasiblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
3. Roberts S.C. *Nat. Chem. Biol.*, 2007, vol. 3, pp. 387–395. DOI: 10.1038/nchembio.2007.8.
4. Xu J.X., Ge X., Dolan M.C. *Biotechnol. Adv.*, 2011, vol. 29, pp. 278–299. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.002.
5. Xu J.X., Zhang W., Cao X., Xue S. *Phytochem. Lett.*, 2011, vol. 4, pp. 52–55. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.12.003.
6. Aslanians L.K., Marshavina Z.V. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 1979, vol. 15, pp. 769–774. (in Russ.).
7. Aslanians L.K., Marshavina Z.V., Kazarian A.G. *Rastitel'nye resursy*, 1988, vol. 24, pp. 107–110. (in Russ.).
8. Bagdasarova Z.M., Aslanians L.K., Uzunian L.V. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 1988, vol. 24, pp. 774–778. (in Russ.).
9. Kaššák P. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014, no. 3, pp. 11–14.
10. Sedel'nikova L.L., Kukushkina T.A. *Uchenye zapiski ZabGU*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 123–128. (in Russ.).
11. Blinova K.F., Kaliupanova N.I. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1974, no. 4, pp. 535. (in Russ.).
12. Blinova K.F., Glyzin V.I., Priakhina N.I. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 1977, no. 1, pp. 535. (in Russ.).
13. Denisova O.A., Glyzin V.I., Patudin A.V., Gavrilenko B.D. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 1980, vol. 14, pp. 76–77. (in Russ.).
14. Jiang D.J., Dai Z., Li Y.J. *Cardiovascular Drug Rev.*, 2004, vol. 22, no. 2, pp. 91–102. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2004.tb00133.x.
15. Pinto M.M.M., Sousa M.E., Nascimento M.S.J. *Current Med Chem.*, 2005, vol. 12, pp. 2517–2538. 10.13181/mji.v22i3.586
16. Fotie J., Bohle D.S. *Antiinfective agents in medicinal chemistry*, 2006, vol. 5, pp. 15–31. DOI: 10.2174/187152106774755563.
17. Kovalev V.N., Mikhailenko O.A., Isaev D.I., Gurbanov G.M. *Azərbaycan əczaçılıq və farmakoterapiya jurnalı*, 2016, no. 1, pp. 13–17. (in Russ.).
18. Jevremović C., Krstić-Milošević D., De Carlo A., Benelli K., Lambardi M., AntoniĆ D., Trifunović M., Momčilov., Lojić M., Subotić A. *Zbornik radova III Simpozijuma biologa i ekologa Republike Srpske. SBERS*. [Proceedings of the III Symposium of Biologists and Ecologists of the Republic of Srpska. SBERS]. 2015, vol. 1, pp. 41–53. DOI: 10.7251/SKP1607041J (in Serbian).
19. Minina S.A., Abu-Skhela G.R.I., Astakhova T.V., Pryakhina N.I., Zenkevich I.G., Kosman V.M. *Pharm. Chem. J.*, 1999, vol. 33, no. 4, pp. 211–213. DOI: 10.1007/BF02509942.
20. Minina S.A., Astakhova T.V., Pryakhina N.I., Abu-Skhela G. *Pharm. Chem. J.*, 2001, vol. 35, no. 2, pp. 85–87. DOI: 10.1023/A:1010472921542.
21. Butenko R.G. *Kul'tura izolirovannykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy*. [Isolated tissue culture and physiology of plant morphogenesis]. Moscow, 1964, 272 p. (in Russ.).

* Corresponding author.

22. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.Ye. *Metody kul'tury v fiziologii i biokhimii rasteniy*. [Culture methods in plant physiology and biochemistry]. Kiev, 1980, 488 p. (in Russ.).
23. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, no. 4, pp. 473–497.
24. Muzychkina R.A. *Tekhnologiya proizvodstva i analiz fitopreparatov*. [Production technology and analysis of phyto-preparations]. Almaty, 2011, 360 p. (in Russ.).
25. GOST 24027.2-80. *Syr'ye lekarstvennoye rastitel'noye. Metody opredeleniya vlazhnosti, sodержaniya zoly, ekstraktivnykh i dubil'nykh veshchestv, efirnogo masla*. [State standard 24027.2-80. Raw medicinal plant. Methods for determining humidity, ash content, extractive and tannins, essential oil]. Moscow, 1981, 10 p. (in Russ.).
26. Obolenskaya A.V. *Laboratornyye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy*. [Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose]. Moscow, 1991, 320 p. (in Russ.).
27. Kosman V.M., Faustova N.M., Pozharitskaia O.N., Shikov A.N., Makarov V.G. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2013, no. 2, pp. 139–146. DOI: 10.14258/jcprm.1302139. (in Russ.).
28. Zyukov D.G. Andreyevich Ye.N., Chipiga A.P. *Tekhnologiya i oborudovaniye efirnomaslichnogo proizvodstva*. [Technology and equipment of essential oil production]. Moscow, 1979, 190 p. (in Russ.).
29. Finter N.B. *J. Gen. Virol.*, 1969, no. 5, pp. 419–427. DOI: 10.1099/0022-1317-5-3-419
30. Dospekhov B.D. *Metodika polevogo opyta*. [Field experience]. Moscow, 1979, 416 p. (in Russ.).
31. Zaytsev G.N. *Matematika v eksperimental'noy botanike*. [Mathematics in Experimental Botany]. Moscow, 1990, 296 p. (in Russ.).
32. Tikhomirova L.I. *Biotekhnologiya*, 2013, no. 2, pp. 74–78. (in Russ.).
33. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIII ed. Moscow, 2015. URL: www.femb.ru/feml. (in Russ.).
34. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Khaliavin I.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2017, no. 2, pp. 119–126. DOI: 10.14258/jcprm.2017021517. (in Russ.).

Received March 23, 2018

Revised September 9, 2018

Accepted September 9, 2018

For citing: Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Ilicheva T.N., Martirosian Iu.Ts., Afanasenkova I.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.

