

УДК 581.192.1:582.734

НАКОПЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ТКАНЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© Л.В. Затонская*, Л.И. Тихомирова, Е.О. Козлова, В.А. Петухов

Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049
(Россия), e-mail: zatonskayalv@list.ru

Разработка теоретических основ оптимизации производственного процесса биологически активных веществ при выращивании лекарственных растений современными методами биотехнологии – одна из главных задач фундаментальных исследований в данной области.

Цель данного исследования – изучение содержания и особенности накопления элементов у регенерантов лекарственных растений, выращенных на питательной среде Мурасиге-Скуга с разным содержанием фитогормонов.

Растения-регенеранты в культуре *in vitro* активно накапливают элементы (K, P, Ca, Mg, Na, Zn, Mn, Fe, B, Al, Cu, Pb, Sr, V, Cr, Ag, Mo, Ti, Ni, Co, Se, Cd). Содержание изученных нами микроэлементов Mn, Zn и Cu находилось на уровне нормальных значений для растительности континентов, Fe в регенерантах *P. alba* – значительно выше. Содержание тяжелых и токсичных металлов Pb, Cd, As, Cr, Ni не превышало нормального уровня в растениях и допустимый уровень для БАД, чая на растительной основе и лекарственного растительного сырья.

Отмечена высокая зависимость накопления элементов у растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul от содержания гормонов в питательной среде. Представители всех трех групп (макроэлементы, микроэлементы и ультрамикроэлементы) имели сходную кривую диаграммы. Максимальный пик располагался на концентрации 2.5 мкМ БАП с ауксинами, далее коэффициент снижался на 5 мкМ БАП, и следующий более низкий пик наблюдали на 5.0 мкМ БАП+А. Самое низкое значение *Kn* приходилось на концентрацию 7.5 БАП. Введение ауксинов на данной концентрации БАП стимулировало еще один пик, и далее коэффициент накопления имел тенденцию к росту при концентрации 10.0 мкМ БАП. Выявленная зависимость делает возможным регуляцию и направленное накопление необходимых для исследователя элементов в тканях растений.

Ключевые слова: содержание микро- и макроэлементов, интактные растения, растения-регенеранты, питательная среда Мурасиге-Скуга, фитогормоны, лекарственные растения.

Введение

Инновационные биотехнологии требуют получения культур лекарственных растений с высоким содержанием биологически активных веществ, что может быть достигнуто различными способами, одним из которых является изменение условий выращивания [1, 2].

Метод культуры тканей и клеток лекарственных растений *in vitro* позволяет получать экологически чистое сырье круглый год, увеличивать выход биологически активных веществ, регулируя их накопление в культуре. Так, в качестве источника алкалоидов успешно культивируются клеточные культуры *Atropa belladonna* L., *Symphytum officinale*, *Aconitum* sp.; алкалоидов и сапонинов – *Nigella* sp.; Витамина Е –

Carthamus tinctorius L.; эфирных масел – *Lavandula* sp., и многие другие растения. Данный метод имеет ряд преимуществ перед использованием интактных растений. Он позволяет получать сырье независимо от климатических условий, поддерживать рост растений круглый год, что важно для видов, имеющих в цикле своего развития периоды покоя. На основе изучения биосинтетических процессов можно получить наиболее богатые тканевые клоны биологически действующих веществ, а

Затонская Лина Викторовна – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры техносферной безопасности и аналитической химии,
e-mail: zatonskayalv@list.ru

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

Козлова Екатерина Олеговна – магистрант,
e-mail: lit-lost@mail.ru

Петухов Виктор Анатольевич – преподаватель кафедры техносферной безопасности и аналитической химии,
e-mail: petukhov-va@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

также заменить интактные растения, природный ареал которых недостаточен для использования в практических целях [3–12].

Растения служат лучшими источниками макро- и микроэлементов и оказывают несомненный терапевтический эффект в лечении человека и животных, так как минеральные вещества находятся в них в наиболее доступной и усвояемой форме и в наборе, свойственном живой природе в целом [13]. Участие в синтезе многих соединений первичного (витамины, липиды, углеводы, ферменты, белки, органические кислоты) и вторичного (эфирные масла, горечи, сердечные гликозиды, сапонины, алкалоиды, кумарины, флавоноиды, дубильные вещества, хромоны и т.д.) синтеза обусловлено в значительной мере их коферментными функциями [14]. Во многих биохимических процессах в растительном организме участвуют флавопротеиновые ферменты. В активации этих ферментов принимают участие Mn, Fe, Cu, Mo, Co, Ni, Sr, V, Cr. Высокие концентрации Mn обеспечивают синтез аскорбиновой кислоты и танидов, количество которых коррелирует с накоплением Mn в растениях [15]. Показано [16], что имеется положительная корреляция между содержанием в чае витамина C и концентрацией Cr, Co, Mg, между количеством флавоноидов и Co, и отрицательная – с Cd. Сапонины в растениях увеличивают проницаемость растительных клеток и способствуют образованию нерастворимых комплексов с Pb.

Эффективность выращивания растений в искусственных условиях в значительной степени зависит от правильного выбора питательной среды. Для культивирования органов и тканей чаще применяют твердую агаросодержащую среду. Любая питательная среда включает следующие группы веществ: макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, аминокислоты, регуляторы роста гормональной природы. При клональном микроразмножении растений наиболее часто используют специально разработанную питательную среду Мурасиге-Скуга [17].

В доступной нам литературе мы не обнаружили сведений о накоплении химических элементов в тканях растений в культуре *in vitro*.

Цель данного исследования – изучение содержания и особенности накопления элементов у регенерантов лекарственных растений, выращенных на питательной среде Мурасиге-Скуга с разным содержанием фитогормонов.

Экспериментальная часть

Растительный материал. Растения в культуре *in vitro* выращивают на питательных средах разного состава. Основой всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимые соли K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Железо используется в виде хелатов (например, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ) или ее динатриевая соль (ЭДТА, трилон Б) – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями. В качестве источника углерода при выращивании гетеротрофных культур в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20–60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза) либо моносахариды (глюкоза, фруктоза, ксилоза и др.).

В качестве объектов в исследованиях использовали регенеранты лекарственных растений: *Potentilla fragarioides* L., *P. chrysantha* Trevir., *P. alba* L., *P. fruticosa* L., *P. longifolia* Willd., виды рода *Iris* L., *Coleus* Lour., *Mentha piperita* L., *Hyssopus officinalis* L., *Althaea officinalis* L. сорт Целитель, *Lophanthus anisatus* Benth., *Ocimum basilicum* L.

Для клонального микроразмножения питательные среды готовили по прописи Мурасиге-Скуга, содержащие 30 г/л сахарозы, 0.7% агар микробиологический, мезоинозит, витамины: никотиновую кислоту, пиридоксин, тиамин гидрохлорид. Содержание основных элементов в среде Мурасиге-Скуга, а также в агаре, воде и сахарозе, использованных для приготовления питательных сред в нашем эксперименте приведены в таблице 1.

Растения выращивали на питательных средах с разным содержанием и сочетанием фитогормонов. Среды готовили с добавлением 0.5–10.0 мкМ БАП (6-бензиламинопурин). В среды с ауксинами (А) вводили 1 мкМ НУК (α -нафтилуксусная кислота) и 0.1 мкМ ИМК (3-индолилмасляная кислота). Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин при 1200 °С. Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота при 24–260 °С.

Методики исследования. Данные по содержанию химических элементов получены методом инверсионной вольтамперометрии на анализаторе ТА-Lab (ООО «НПП «Томьаналит»). Измерения массовых концентраций Zn, Cd, Pb и Cu выполняли на анализаторе вольтамперометрическом после предварительной подготовки гомогенизированных проб лекарственного растительного сырья путем «мокрой» минерализации навески 1.0 г (при нагревании с концентрированной HNO₃, с добавлением 30% раствора перекиси водорода) и последующего полного озоления в камере печи ПДП-Lab при температуре 450 °С. Перед анализом полученный осадок растворяли в 1.0 мл концентрированной муравьиной кислоты, перемешивали стеклянной палочкой, давали раствору отстояться 2–3 мин и добавляли 9.0 мл бидистиллированной воды, перемешивали [18].

Методом инверсионной вольтамперометрии определяли массовую концентрацию каждого элемента в анализируемой пробе, вычисления проводились автоматически с помощью программного обеспечения анализатора (программа ТА-Lab) по формуле

$$X_i = \frac{I_1 \cdot C_{доб} \cdot V_{доб} \cdot V_{мин}}{(I_2 - I_1) \cdot m \cdot V_{ал}}$$

где X_i – содержание данного элемента в анализируемой пробе, мг/кг; I₁ – величина пика элемента в анализируемой пробе, мкА; I₂ – величина пика элемента в пробе с добавкой, мкА; C_{доб} – концентрация аттестованной смеси элемента, из которой делается добавка к анализируемой пробе, мг/л; V_{доб} – объем добавки аттестационной смеси элемента, мл; V_{мин} – объем минерализата, полученного растворением золы в известном объеме растворителя, мл; V_{ал} – объем аликвоты, взятой для анализа из минерализата, мл; m – масса пробы, взятой для анализа, г.

Исследование элементного состава (табл. 2–4) проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) на атомно-эмиссионном ИСП-спектрометре Optima 7300 DV фирмы Perkin Elmer (США). Для проведения спектрального анализа на ИСП-спектрометре образцы лекарственного растительного сырья предварительно измельчали, навеску 1.0 г заливали азотной кислотой, разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1 : 1 и помещали в микроволновую печь. Охлажденный сосуд с минерализованной пробой ставили в вытяжной шкаф и выдерживали до прекращения видимого выделения коричневого дыма. Минерализат был прозрачным. При уменьшении объема его доводили дистиллированной водой до нужного значения. Полученный таким образом раствор пробы переносили в сосуд из кварцевого стекла для проведения идентификации и количественного определения химических элементов.

При оценке интенсивности накопления химических элементов органами растений-регенерантов рассчитаны коэффициенты накопления (К_н) – отношение содержание элемента в органах к содержанию в среде. Для классификации элементов по данному коэффициенту использовали выделенные А.И. Перельманом группы: 1) энергичного накопления (100 > К_н ≥ 10); 2) сильного накопления (10 > К_н ≥ 1); 3) слабого накопления и среднего захвата (1 > К_н ≥ 0.1); 4) слабого захвата (0.1 > К_н ≥ 0.01); 5) очень слабого захвата (0.01 > К_н ≥ 0.001) [19, 20].

Таблица 1. Содержание основных элементов в среде Мурасиге-Скуга

Компоненты	Содержание, мг/л	Содержание элементов		
		массовая доля, %	мг/л	
KNO ₃	1900	K – 38.7	735.3	
KH ₂ PO ₄	170	K – 28.7	48.8	
KI	0.83	K – 76.4	0.6	
Na ₂ -ЭДТА·2H ₂ O (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂ Na ₂ ·2H ₂ O)	37.3	Na – 12.3	4.6	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	Ca – 27.3	120.1	
MgSO ₄ ·4H ₂ O	370	Mg – 9.9	36.6	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	Fe – 20.1	5.6	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	Mn – 24.6	5.5	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Zn – 22.7	1.9	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Na – 19.0	0.05	
		Mo – 39.6	0.1	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	Co – 24.8	0.07	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	Cu – 25.5	0.01	
Содержание химических элементов, мг/кг				
	Cd	Pb	Cu	Zn
Сахароза	<0.0015	0.05±0.02	0.3±0.1	4.3±1.7
Агар микробиологический	<0.0015	0.07±0.02	0.6±0.2	7.1±2.8
Вода дистиллированная	<0.0002	0.0005±0.0002	0.0021±0.0008	0.05±0.01

Обсуждение результатов

Изучение особенности накопления элементов у лекарственных растений, выращенных на питательной среде Мурасиге-Скуга. В формировании элементного химического состава растений участвуют два ведущих фактора – генетический и экологический. В зависимости от условий выращивания их соотношение меняется. Если геохимическая обстановка соответствует требованиям растений, то в элементном химическом составе, главным образом, отражается влияние генетического фактора. При этом осуществляется генотипическая программа поглощения химических элементов, выдерживается качественный и количественный регламент насыщения тканей ионами [21].

В отделе биотехнологии Алтайского государственного университета размножают и выращивают лекарственные растения, принадлежащие разным родам и видам. *Iris sibirica* L. представлен 3 сортами. Нами изучен элементный состав, в том числе у представителей нескольких видов рода Лапчатки (*Potentilla* L.) и рода Ириса (*Iris* L.). Для оценки интенсивности накопления элементов из питательной среды MS (табл. 1) рассчитали K_n микроэлементов-биофилов (Cu, Zn) и его V (коэффициент вариации). Необходимо отметить, что у всех представленных сортообразцов растений данные элементы относятся к группе энергичного накопления ($100 > K_n \geq 10$). Вероятно, это связано с тем, что в отличие от почвы питательная среда содержит элементы в наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями. Тем не менее изменчивость признака (K_n) для Cu и Zn относится к значительной. Это говорит о том, что разные виды растений по-разному накапливают элементы на одной и той же питательной среде. И только внутривидовая изменчивость у *Iris sibirica* по коэффициенту накопления Cu у разных сортов относится к средней ($10 > V > 20$). Наши данные подтверждают выводы о ведущей роли генетического фактора в формировании элементного химического состава растений (табл. 2).

В исследованиях *I. sibirica* и *P. alba* [9, 12] показано, что качественный состав элементов, обнаруженных у растений-регенерантов и интактных растений, идентичен, тогда как количественное содержание существенно отличалось.

В наших исследованиях изучение элементного состава некоторых видов лекарственных растений-регенерантов проводили в сравнении с интактными растениями (*P. fragarioides*, *P. chrysantha*, *P. fruticosa*, *Alt. officinalis*). Наблюдали особенность в содержании микроэлементов-биофилов Cu и Zn (табл. 3).

Содержание Pb у растений-регенерантов *P. chrysantha*, *P. fruticosa*, *Alt. officinalis* меньше, чем у интактных растений. Для *P. fragarioides* содержание данного элемента не зависело от способа выращивания растений (табл. 3). Концентрация Cd составила менее 0.0015 мг/кг для всех видов сырья.

Таблица 2. Коэффициенты накопления химических элементов в органах растений-регенерантов

Название	Cu		Zn	
	Содержание, мг/кг	K_n	Содержание, мг/кг	K_n
<i>Potentilla</i> L.				
<i>P. fragarioides</i> L.	1.1±0.4	110	136±53	72
<i>P. chrysantha</i> Trevir.	1.1±0.4	110	124±48	65
<i>P. alba</i> L.	2.0±0.8	200	118±46	62
<i>P. fruticosa</i> L.	1.1±0.4	110	39±15	21
<i>Potentilla longifolia</i> Willd	1.1±0.4	110	76±30	40
V, %		29		37
<i>Iris</i> L.				
<i>Iris spuria</i>	4.8±1.0	480	168±42	88
<i>Iris sibirica</i> L., сорт Sailors Fancy	1.0±0.4	98	53±21	28
<i>Iris sibirica</i> L., сорт Cambridge	1.10±0.01	110	74±18	39
<i>Iris sibirica</i> L., сорт Стрех	0.800±0.005	80	92±23	48
<i>Iris sibirica</i> V, %		13		22
<i>Iris</i> L., V, %		87		45
Представители разных родов лекарственных растений				
<i>Coleus</i> Lour., Колеус	0.13±0.05	13	84±33	44
<i>Mentha piperita</i> L.	0.3±0.1	31	43±17	22
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	0.8±0.3	78	48±19	25
<i>Althaea officinalis</i> L., сорт Целитель	3.6±1.4	360	30±12	16
<i>Lophanthus anisatus</i> Benth.	0.7±0.3	68	42±16	22
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0.8±0.3	76	48±19	22
V, %		91		54

Таблица 3. Содержание химических элементов в органах регенерантов в сравнении с интактными растениями

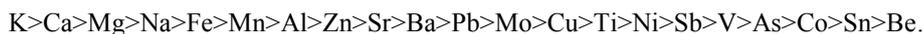
Название	Содержание химического элемента, мг/кг					
	Pb		Cu		Zn	
	регенеранты	интактные	регенеранты	интактные	регенеранты	интактные
<i>P. fragarioides</i>	0.24±0.09	0.22±0.09	1.1±0.4	3.6±1.4	136±53	55±21
<i>P. chrysantha</i>	0.21±0.08	0.36±0.14	1.1±0.4	3.4±1.3	124±48	56±22
<i>P. fruticosa</i>	0.11±0.04	0.17±0.07	1.1±0.4	2.0±0.8	40±16	66±26
<i>Althaea officinalis</i>	0.09±0.03	0.10±0.04	3.6±1.4	4.6±1.8	30±12	46±18
Среднее	0.16	0.21	1.7	3.4	82	56

Примечание: содержание кадмия менее 0.0015 мг/кг.

Медь интактные растения содержат в 2 раза больше, чем регенеранты (табл. 3). В норме медь в растениях содержится в пределах 3–40 мг/кг воздушно-сухой массы. Благоприятное содержание меди в растениях важно как для здоровья самих растений, так и для их использования в питании человека и животных.

Для Zn характерна вариабельность в пределах рода *Potentilla* L. Растения-регенеранты *P. fragarioides* и *P. chrysantha* содержали цинк практически в 2.5 раза больше в сравнении с интактными, а регенеранты *P. fruticosa* – в 1,7 раза меньше. У *Alt. officinalis* Zn накапливается в 1,5 раза больше у интактных растений в сравнении с регенерантами (табл. 3). Основные функции цинка в растениях связаны с метаболизмом углеводов, протеинов и фосфатов, а также с образованием ауксина, ДНК и рибосом. Растения содержат обычно 15–150 мг/кг сухой массы [22, 23].

На основании данных спектрометрического анализа в биомассе растений-регенерантов *I. sibirica* определен 21 химический элемент, составлен ряд предпочтительного накопления [12]:



В биомассе растений-регенерантов *I. spuria* нами определены 22 химических элемента:



Сравнивая два вида *I. sibirica* и *I. spuria*, выращенных на питательной среде MS, в предпочтительном накоплении элементов отмечали видоспецифичность.

Химические элементы растений в высоких концентрациях могут проявлять токсическое действие. Особенно важно знать допустимое содержание для нового вида лекарственного растительного сырья, получаемого на основе методов биотехнологии. Содержание микроэлементов, тяжелых металлов и мышьяка в растениях-регенерантах *P. alba*, *Iris sibirica*, *Iris spuria*, выращенных на среде Мурасиге-Скуга, сравнивали с допустимыми нормами. Изученные нами микроэлементы Mn, Zn и Cu находились на уровне нормальных значений для растительности континентов, Fe в регенерантах *P. alba* – значительно выше. Содержание тяжелых и токсичных металлов Pb, Cd, As, Cr, Ni, а также Cr и Ni не превышало нормального уровня в растениях и допустимый уровень для БАД, чая на растительной основе и лекарственного растительного сырья (табл. 4).

Таблица 4. Содержание микроэлементов в растениях-регенерантах *P. alba*, *Iris sibirica*, *Iris spuria* и нормирование содержания, мг/кг сухого вещества

	<i>P. alba</i> , мг/кг	<i>Iris sibirica</i> , мг/кг	<i>Iris spuria</i> , мг/кг	Нормирование содержания, мг/кг [23–27]						
				Низкое	Нормальное	Токсическое	Среднее	ПДК для БАД	ПДК для чая	ГФ XIII издания
Fe	939±188	216±43	122±24	<50	50–250	–	200	–	–	–
Mn	122±24	176±35	150±30	<20	25–250	>500	205	–	–	–
Zn	118±24	92±18	168±34	<20	25–250	>400	30	–	–	–
Cu	2.0±0.4	0.8±0.2	4.8±1.0	<5	6–15	>20	8.0	–	–	–
Pb	0.6±0.1	3.3±0.7	2.5±0.5	–	2–4	–	1.25	6.0	10.0	6.0
Cd	0.020±0.004	<0.0001	0.046±0.009	–	0–0.5	>100	0.035	1.0	1.0	1.0
Cr	<0.001	<0.001	1.4±0.4	–	0–0.5	–	1.8	–	–	–
Ni	0.8±0.2	0.20±0.04	0.38±0.08	–	0–8	>80	2.0	–	–	–
As	0.20±0.05	<0.001	<0.001	–	–	–	–	0.5	1.0	0.5

Примечание: «–» – данные отсутствуют

*Накопление элементов у регенерантов *Iris spuria* на питательной среде с разным содержанием фитогормонов.* Фитогормоны являются мощными стимуляторами роста растений. Уровень гормонов роста, как известно, оказывает положительный эффект на синтез метаболитов [28]. Например, 2,4-Д снижает синтез [29], тогда как увеличение синтеза было отмечено с НУК или гетероауксином [30]. В культуре *Catharanthus roseus* ауксины способствовали индукции каллуса, но увеличение выработки вторичных метаболитов отмечали на безгормональной среде [28]. Динамика накопления элементов в процессе роста согласуется с физиологическими процессами, протекающими в растении.

В наших исследованиях растения-регенеранты *Iris spuria* выращивали на питательных средах на основе MS с разным содержанием фитогормонов: 2.5–10.0 мкМ БАП, а также дополненных ауксинами 1 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК. Всего 8 вариантов. Контролем служила питательная среда, содержащая 1.0 мкМ БАП. У макроэлементов Ca, Mg и Na (рис. 1а) наблюдается высокая зависимость накопления элементов от содержания гормонов в питательной среде при концентрации 2.5 мкМ БАП с ауксинами, снижается при концентрации 5.0 мкМ БАП и далее содержание варьирует.

У микроэлементов Zn, Mn, Fe, Sr, Mo (рис. 1б, в) прослеживается возрастание до максимального пика на концентрации 2.5 мкМ БАП с ауксинами, далее плавно снижается на 5.0 мкМ БАП и следующий более низкий пик для Zn, Mn, Fe, Mo наблюдается на 7.5 мкМ БАП. Для Sr минимальное значение определяли при 7.5 мкМ БАП с ауксинами.

Для Cr, Ag и Ti наблюдается противоположная зависимость, их накопительная способность возрастает при концентрации 7.5 мкМ БАП с ауксинами.

Для Cu и V наибольшее накопление наблюдали в контрольной среде при концентрации 1 мкМ БАП (рис. 2).

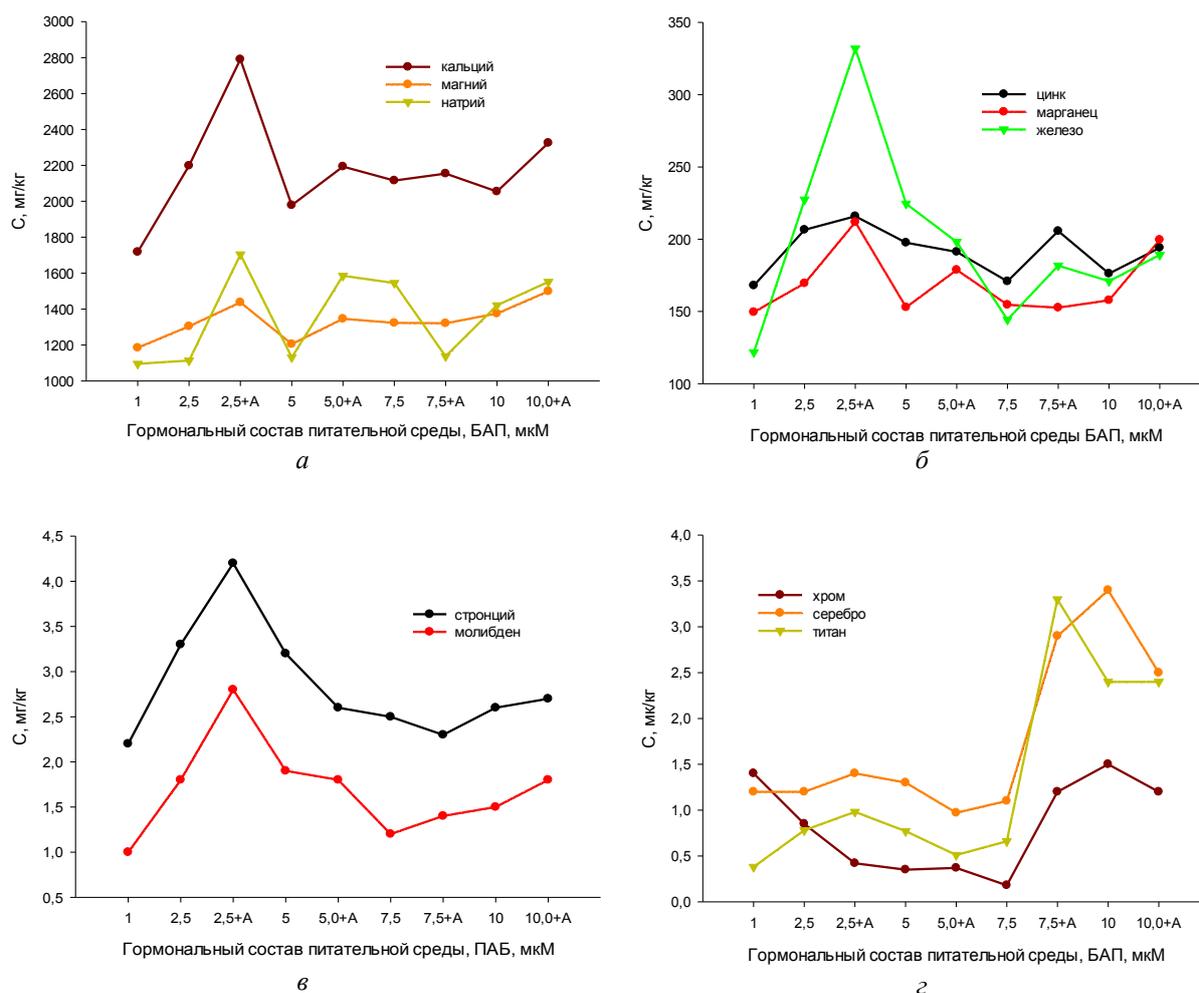


Рис. 1. Зависимость накопления химических элементов у растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul от гормонального состава питательных сред: а) макроэлементов, б–г) микроэлементов

Ауксины и цитокинины добавляют в среду для стимуляции деления клеток *in vitro*. Показано, что ауксины активируют CDK–протеинкиназы клеточного цикла, а цитокинины – соответствующие циклины. Комплекс CDK–циклин необходим для запуска клеточного деления [31]. *Iris spuria* в культуре ткани не требователен к высоким концентрациям БАП. Ауксины положительно влияют на содержание элементов в его тканях, в преобладающем большинстве случаев их внесение в среды стимулировало увеличение количества элементов.

Для большей информативности результатов исследования мы рассчитали коэффициент накопления некоторых элементов в зависимости от содержания фитогормонов в питательной среде при выращивании растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul. На диаграмме (рис. 3) отмечали высокую зависимость накопления элементов от содержания гормонов в питательной среде. Представители всех трех групп (макроэлементы, микроэлементы и ультрамикроэлементы) имеют кривые диаграммы, сходные между собой. Максимальный пик располагается на концентрации 2.5 мкМ БАП с ауксинами, далее коэффициент снижается на 5.0 мкМ БАП и следующий более низкий пик наблюдается на 5.0 мкМ БАП+А. На концентрации 7.5 мкМ БАП зафиксировано самое низкое значение *Kn*. Введение ауксинов на данной концентрации БАП стимулировало еще один пик, и далее коэффициент накопления имел тенденцию к росту при концентрации 10.0 мкМ БАП.

Как отмечают А.И. Попов и Ю.Н. Дементьев, особый интерес представляют микроэлементы, которые в больших количествах накапливаются в период полуформирования листьев (июль), что, вероятнее всего, объясняется наиболее активным протеканием ферментативных процессов и накоплением необходимого количества ферментов, которые связаны с микроэлементами. Калий и фосфор активируют многие ферменты, чем моложе растение, тем больше в нем калия. В то же время калий, кальций и фосфор играют важную роль в синтезе белков и, следовательно, при недостатке указанных элементов нарушается рост и формирование листьев. Кальций рассматривается как стабилизатор мембран в растительных клетках и при его недостатке наблюдаются ультраструктурные нарушения. Ионы цинка, наряду с ионами кальция, участвуют в транспорте ионов через мембрану. Магний действует как активатор метаболизма и как составная часть прочного комплексного соединения – хлорофилла, одного из самых важных соединений, созданных природой. Бор, цинк, марганец, медь влияют на размножение растений [13].

В источниках научной литературы отражена сезонная динамика накопления элементов в отдельных органах растений в связи с протеканием физиологических процессов в организме. Для регенерантов в культуре ткани сезонная закономерность не характерна. На этапе собственно микроразмножения растение находится постоянно в стадии активного роста. Экспериментальным путем подбирают наиболее сбалансированный качественный и количественный состав фитогормонов для увеличения коэффициента размножения и получения стандартных побегов для последующего их укоренения. На этом основана методика клонального микроразмножения. Следовательно, регенеранты постоянно активно используют из питательной среды все необходимые макро- и микроэлементы при формировании вегетативной массы под контролем внесенных фитогормонов.

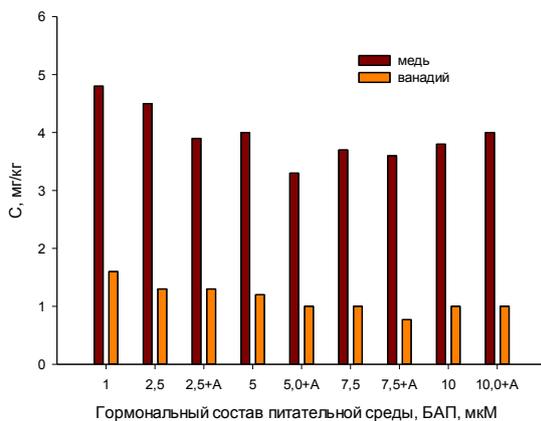


Рис. 2. Зависимость накопления Cu и V у растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul от гормонального состава питательных сред

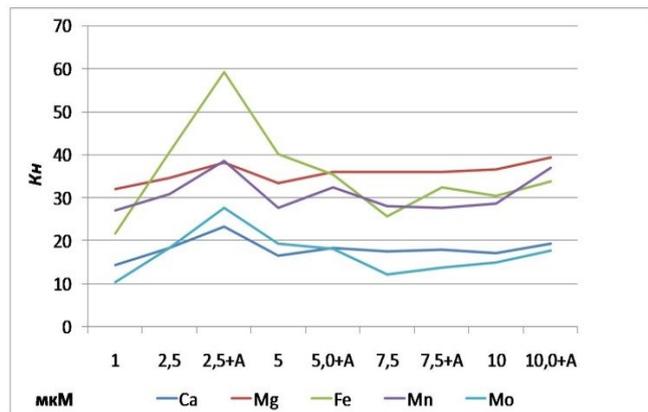


Рис. 3. Зависимость коэффициента накопления элементов у растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul от гормонального состава питательных сред

Заключение

В последние годы большое внимание уделяется доброкачественности и экологической чистоте заготавливаемого лекарственного сырья. Методы биотехнологии позволяют получать растительное сырье высокого качества независимо от сезона. Растения-регенеранты в культуре *in vitro* активно накапливают элементы. Содержание изученных нами микроэлементов Mn, Zn и Cu находилось на уровне нормальных значений для растительности континентов, Fe в регенерантах *P. alba* – значительно выше. Содержание тяжелых и токсичных металлов Pb, Cd, As, Cr, Ni не превышало нормального уровня в растениях и допустимый уровень для БАД, чая на растительной основе и лекарственного растительного сырья.

В своих исследованиях мы отмечали высокую зависимость накопления элементов у растений-регенерантов *Iris spuria* сорт *Art And Soul* от содержания гормонов в питательной среде. Представители всех трех групп (макроэлементы, микроэлементы и ультрамикроэлементы) имели сходную кривую диаграммы. Максимальный пик располагался на концентрации 2.5 мкМ БАП с ауксинами, далее коэффициент снижался на 5 мкМ БАП, и следующий более низкий пик наблюдали на 5.0 мкМ БАП+А. Самое низкое значение Кн приходилось на концентрацию 7.5 мкМ БАП. Введение ауксинов на данной концентрации БАП стимулировало еще один пик, и далее коэффициент накопления имел тенденцию к росту при концентрации 10.0 мкМ БАП. Выявленная зависимость делает возможным регуляцию и направленное накопление необходимых для исследователя элементов в тканях растений.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 152 с.
2. Zaprometov M. The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and the possibility of its regulation // *Advances in Cell Culture*. 1989. Vol. 7. Pp. 201–260.
3. Загоскина Н.В. Биофлавоноиды в культивируемых *in vitro* клетках растений // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2018. №13. С. 269–273.
4. Cheng I.F., Breen K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron–ATP complex // *BioMetals*. 2000. Vol. 13. N3. Pp. 77–83. DOI: 10.1023/A:1009229429250.
5. Mee J.J., Jae S.C., Hyun A.J., Ji Y.K., Hae Y.C. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation // *Arch. Pharm. Res.* 2003. Vol. 26. N10. Pp. 809–815.
6. Дорофеев В.Ю., Карначук Р.А., Шилова И.В. Элементный состав клеток каллусной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2008. №2(3). С. 12–17.
7. Matkowski A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review // *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 26. N6. Pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
8. Tadhani M., Patel V. Subhash R. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus // *J. Food Compos. Analysis*. 2007. Vol. 27(3). Pp. 323–329. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.
9. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Фитохимический анализ биотехнологического сырья представителей рода *Potentilla* L. // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734.
10. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартирисян 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.
11. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sinitsyna A.A. Histochemical Study of Xylem Cells in Vitro Culture of *Iris sibirica* L. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018. Vol. 44. №7. Pp. 860–869.
12. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Khalavin I.A. Element Composition of *Iris sibirica* L. in Vitro Culture // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018. Vol. 44(7). Pp. 893–898. DOI: 10.1134/S1068162018070130.
13. Попов А.И., Дементьев Ю.Н. Исследование химических элементов в листьях голубики обыкновенной в процессе онтогенеза // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2017. №9. С. 91–96.
14. Ноздрюхина Л.Р., Гринкевич Н.И. Нарушение микроэлементного обмена и пути его коррекции. М., 1980. 280 с.
15. Austenfeld F.A. Zur Phytotoxizität von Nickel und Kobaltsalzen in Hydrokultur bei *Phaseolium vulgare* L. // *Z. Pflanzenzuechn. und Bodenkunde*. 1979. Vol. 142. N6. Pp. 769–777.
16. Немерешина О.Н., Гусев Н.Ф., Филиппова А.В. Содержание водорастворимых антиоксидантов и микроэлементов в образцах чая // Успехи современного естествознания. 2013. №11. С. 54–64.
17. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiol. Plant*. 2006. Vol. 15. N4. Pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
18. ФР.1.31.2004.00.986. Методика выполнения измерений массовой концентрации цинка, кадмия, свинца и меди в пищевых продуктах, продовольственном сырье, кормов и продуктов их переработки, биологически активных

- добавках к пище, биологических объектах методом инверсионной вольтамперометрии на анализаторах типа ТА-Lab (свидетельство об аттестации № 31-04/04 от 26.12.2003 г).
19. Перельман А.И. Геохимия. М.: Высшая школа, 1989. 528 с.
 20. Афанасьева Л.В. Содержание микроэлементов в ягодах *Vaccinium vitis-idaea* в Южном Прибайкалье // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 103–108. DOI: 10.14258/jcrpm.2016031197.
 21. Ельчианинова О.А., Рождественская Т.А., Черных Е.Ю. Микроэлементы-биофилы и тяжелые металлы в лекарственных растениях Северного Алтая // Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее. Материалы Международной конференции. Горно-Алтайск, 2008. С. 51–55.
 22. Ильин В.Б. Элементный химический состав растений. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1985. 129 с.
 23. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности продуктов. М., 2001. 269 с.
 24. Добровольский В.В. Биосферные циклы тяжелых металлов и регуляторная роль почвы // Почвоведение. 1997. №4. С. 431–441.
 25. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва–растение. Новосибирск, 1991. 151 с.
 26. Сосорова С.Б., Меркушева М.Г., Убугунов Л.Л. Содержание микроэлементов в лекарственных растениях разных экосистем озера Коктокольского (Западное Забайкалье) // Химия растительного сырья. 2016. №2. С. 53–59. DOI: 10.14258/jcrpm.201602697.
 27. Государственная фармакопея РФ XIII издания. М., 2015. URL: <http://femb.ru>.
 28. Misawa M. Production of useful plant metabolites // Adv Biochem Eng Biotechnol. Springer–Verlag, Berlin, 1985. Pp. 59–88.
 29. Dicosmo F., Misawa M. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production // Biotechnology Advances. 1995. Vol. 13(3). Pp. 425–453.
 30. Ramachandra R.S., Ravinshankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2002. Vol. 20. N2. Pp. 101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
 31. Чуб В.В. Рост и развитие растений. М., 2005. 640 с.

Поступила в редакцию 16 мая 2019 г.

После переработки 2 марта 2020 г.

Принята к публикации 3 марта 2020 г.

Для цитирования: Затонская Л.В., Тихомирова Л.И., Козлова Е.О., Петухов В.А. Накопление химических элементов в тканях лекарственных растений в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 261–270. DOI: 10.14258/jcrpm.2020025540.

*Zatonskaya L.V.**, *Tikhomirova L.I.*, *Kozlova Ye.O.*, *Petukhov V.A.* ACCUMULATION OF CHEMICAL ELEMENTS IN TISSUES OF MEDICINAL PLANTS IN VITRO CULTURE

Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: zatonskayalv@list.ru

Development of theoretical bases of optimization of the production process of biologically active substances in the cultivation of medicinal plants by modern methods of biotechnology is one of the main tasks of fundamental research in this area.

The aim of this study was to study the content and features of the accumulation of elements in regenerants of medicinal plants grown on the nutrient medium Murashige-Skoog with different content of phytohormones.

Regenerant plants in vitro culture actively accumulate elements (K, P, Ca, Mg, Na, Zn, Mn, Fe, B, Al, Cu, Pb, Sr, V, Cr, Ag, Mo, Ti, Ni, Co, Se, Cd). The content of the trace elements Mn, Zn and Cu that we studied was at the level of normal values for the vegetation of the continents, Fe in *P. alba* regenerants – much higher. The content of heavy and toxic metals Pb, Cd, As, Cr, Ni did not exceed the normal level in plants and the acceptable level for dietary supplements, plant-based tea, and medicinal plant materials.

The high dependence of the accumulation of elements in plants-regenerants *Iris spuria* Art And Soul variety on the content of hormones in the nutrient medium was noted. Representatives of all three groups (macronutrients, trace elements and ultramicroelements) had a similar curve diagram. The maximum peak was located at a concentration of 2.5 μm BAP with auxins, then the coefficient decreased by 5 μm BAP, and the next lower peak was observed at 5.0 μm BAP+A. the Lowest value of KN was at a concentration of 7.5 μm BAP. The introduction of auxins at this BAP concentration stimulated another peak, and then the accumulation coefficient tended to increase at a concentration of 10.0 μm BAP. The revealed dependence makes possible the regulation and directed accumulation of elements necessary for the researcher in plant tissues.

Keywords: the content of micro- and macroelements, intact plants, regenerant plants, Murashige and Skoog medium, phytohormones, medicinal plants.

* Corresponding author.

References

1. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove*. [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]. Moscow, 1999, 152 p. (in Russ.).
2. Zaprometov M. *Advances in Cell Culture*, 1989, vol. 7, pp. 201–260.
3. Zagoskina N.V. *Novyye i netraditsionnyye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya*. 2018, no. 13, pp. 269–273. (in Russ.).
4. Cheng I.F., Breen K. *BioMetals*, 2000, vol. 13, no. 3, pp. 77–83. DOI: 10.1023/A:1009229429250.
5. Mee J.J., Jae S.C., Hyun A.J., Ji Y.K., Hae Y.C. *Arch. Pharm. Res.*, 2003, vol. 26, no. 10, pp. 809–815.
6. Dorofeyev V.Yu., Karnachuk R.A., Shilova I.V. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*, 2008, no. 2(3), pp. 12–17. (in Russ.).
7. Matkowski A. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, no. 6, pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
8. Tadhani M., Patel V. Subhash R. *J. Food Compos. Analysis*, 2007, vol. 27(3), pp. 323–329. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.004.
9. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734. (in Russ.).
10. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'icheva T.N., Martirosyan YU.TS., Afanasenkova I.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, p. 235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887. (in Russ.).
11. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sinitsyna A.A. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 7, pp. 860–869.
12. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Khalavin I.A. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44(7), pp. 893–898. DOI: 10.1134/S1068162018070130.
13. Popov A.I., Dement'yev Yu.N. *Vestnik krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2017, no. 9, pp. 91–96. (in Russ.).
14. Nozdryukhina L.R., Grinkevich N.I. *Narusheniye mikroelementnogo obmena i puti yego korrleksii*. [Violation of trace elements and ways of its correction]. Moscow, 1980, 280 p. (in Russ.).
15. Austenfeld F.A. Z. *Pflanzenernahr. und Bodenkunde*, 1979, vol. 142, no. 6, pp. 769–777.
16. Nemereshina O.N., Gusev N.F., Filippova A.V. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*, 2013, no. 11, pp. 54–64. (in Russ.).
17. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant*, 2006, vol. 15, no. 4, pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399–3054.1962.tb08052.x.
18. FR.1.31.2004.00.986 *Metodika vypolneniya izmereniy massovoy kontsentratsii tsinka, kadmiya, svintsa i medi v pishchevykh produktakh, prodovol'stvennom syr'ye, kormov i produktov ikh pererabotki, biologicheski aktiv-nykh do-bavkakh k pishchi, biologicheskikh ob'yektakh metodom inversionnoy vol'tamperometrii na analizatorakh tipa TA–Lab (svidetel'stvo ob attestatsii № 31-04/04 ot 26.12.2003 g)* [FR.1.31.2004.00.986 Methodology for measuring the mass concentration of zinc, cadmium, lead and copper in food products, food raw materials, feed and processed products, biologically active food additives, biological objects by inverse voltammetry on type analyzers TA – Lab (certificate of certification No. 31-04 / 04 of December 26, 2003)]. (in Russ.).
19. Perel'man A.I. *Geokhimiya*. [Geochemistry]. Moscow, 1989, 528 p. (in Russ.).
20. Afanas'yeva L.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 103–108. DOI: 10.14258/jcprm.2016031197. (in Russ.).
21. Yel'chinina O.A., Rozhdestvenskaya T.A., Chernykh Ye.Yu. *Bioraznoobraziye, problemy ekologii Gornogo Altaya i sopredel'nykh regionov: nastoyashcheye, proshloye, budushcheye. Materialy Mezhdunarodnoy konferentsii*. [Biodiversity, environmental problems of the Altai Mountains and adjacent regions: present, past, future. Materials of the International Conference]. Gorno-Altaysk, 2008, pp. 51–55. (in Russ.).
22. Il'in V.B. *Elementnyy khimicheskiy sostav rasteniy*. [Elemental chemical composition of plants]. Novosibirsk, 1985, 129 p. (in Russ.).
23. SanPiN 2.3.2.1078-01. *Gigiyenicheskiye trebovaniya k bezopasnosti i pishchevoy tsennosti produktov*. [SanPiN 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and nutritional value of products]. Moscow, 2001, 269 p. (in Russ.).
24. Dobrovolskiy V.V. *Pochvovedeniye*, 1997, no. 4, pp. 431–441. (in Russ.).
25. Il'in V.B. *Tyazholye metally v sisteme pochva–rasteniye*. [Heavy metals in the soil–plant system]. Novosibirsk, 1991, 151 p. (in Russ.).
26. Sosorova S.B., Merkusheva M.G., Ubugunov L.L. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2016, no. 2, pp. 53–59. DOI: 10.14258/jcprm.201602697. (in Russ.).
27. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIII izdaniya*. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XIII edition]. Moscow, 2015, URL: <http://femb.ru>. (in Russ.).
28. Misawa M. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. Springer-Verlag, Berlin, 1985, pp. 59–88.
29. Dicosmo F., Misawa M. *Biotechnology Advances*, 1995, vol. 13(3), pp. 425–453.
30. Ramachandra R.S., Ravinshankar G.A. *Biotechnology Advances*, 2002, vol. 20, no. 2, pp. 101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
31. Chub V.V. *Rost i razvitiye rasteniy*. [Plant growth and development]. Moscow, 2005, 640 p. (in Russ.).

Received May 16, 2019

Revised March 2, 2020

Accepted March 3, 2020