

**Национальная академия наук Кыргызской Республики
Институт биотехнологии**

Диссертационный совет Д.03.10.418

На правах рукописи
УДК 633.88(575.2)(043.3)

АСАНАКУНОВ БАКТЫБЕК АШЫМОВИЧ

**Сохранение биоразнообразия и практическое использование растений рода
Scutellaria методами биотехнологии**

03.01.06 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Бишкек – 2012

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии растений Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики

Научный руководитель: **Умралина Анара Рустамовна,**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Серикбаева Асия Демеухановна,**
доктор биологических наук

Загурский Алексей Васильевич,
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент

Ведущая организация: **Республиканское Государственное
Предприятие Институт биологии и
биотехнологии растений Комитета
науки Министерства образования и
науки Республики Казахстан,**
г. Алматы, ул. Тимирязева, 45

Защита состоится « 8 » июня 2012 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.03.10.418 при Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: Кыргызская Республика, г. Бишкек, проспект Чуй, 265.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: г. Бишкек, проспект Чуй, 265а.

Автореферат разослан « » _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, с.н.с. _____ Корчубекова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Род *Scutellaria* (шлемник) семейства *Lamiaceae* является одним из известных лекарственных родов растений. Корни различных видов *Scutellaria* являются местом синтеза и накопления ценных флавонов – флавоноидов (Malikov, V.M. and Yuldashev M.P., 2002.). Флавоноиды *Scutellaria* относятся к числу высокоактивных фенольных соединений, обладающих антиоксидантной, седативной, противовоспалительной, цитотоксической активностью.

Фармакологическая значимость растений этого рода определяется не только флавоноидами, которые синтезируются в их корнях, и представляют большой интерес для создания препаратов, обладающих противоопухолевой, антимикробной и нейропротекторной активностью. В шлемниках также обнаруживаются физиологически активные соединения, относящиеся к другим классам вторичных веществ, такие как актеозид, фенилэтаноид, и мелатонин, принадлежащий к числу животных гормонов, которые также представляют интерес для фармацевтической промышленности (Murch S.J. et al. 2004).

Scutellaria baicalensis Georgi (шлемник байкальский) является наиболее изученным и используемым видом шлемников в народной и традиционной медицине ряда стран (Tang W. and Eisenbrand G., 1992). Интенсивное использование *S. baicalensis* приводит к сокращению естественных растительных ресурсов этого вида шлемника. Шлемники размножаются только семенами, которые образуются на 12-15 год. В связи с этим приобретает актуальность поиск альтернативных видов растений рода *Scutellaria* как потенциальных источников лекарственного сырья.

В Кыргызстане произрастает более 30 видов этого рода, 16 из которых являются эндемиками. Поскольку эти виды ранее не изучались, то становится очевидной актуальность их исследований с применением методов биотехнологии для сохранения их биоразнообразия и выявления возможностей их использования с целью получения ценных биологически активных веществ. Введение растений рода *Scutellaria* Кыргызстана в культуру *in vitro* может служить основой разработки биотехнологических приемов для сохранения в стерильной культуре, в частности в виде «искусственных семян». Скрининг потенциально фармакологически ценных видов даст возможность использовать их для получения нового ценного и экологически чистого растительного лекарственного сырья, что позволит снизить потери естественных популяций.

В связи с этим изучение методами биотехнологии шлемников, произрастающих в Кыргызстане, представляет большой научный и практический интерес.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научным

учреждением. Настоящая работа выполнена в соответствии с научной программой «Разработка методов сохранения и рационального использования растительных ресурсов Кыргызстана» в рамках программ Института биотехнологии НАН КР «Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и растений и их охрана от заболеваний с использованием методов биотехнологии», № Госрегистрации – 0004011, и «Создание основ банка генетических ресурсов животных, растений, микроорганизмов и использование его в целях инновационной биотехнологии», № Госрегистрации – 0006404.

Цель и задачи исследования. Цель работы – отработать биотехнологические методы с целью сохранения *ex situ* и изучения биологического потенциала растений рода *Scutellaria* дикорастущей флоры Кыргызстана как возможного источника лекарственного сырья.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Разработать протоколы криоконсервации гермоплазмы шлемников для хранения в генетическом банке.

2. Ввести в культуру *in vitro* и подобрать питательные среды для микроразмножения и укоренения стерильных проростков и получить линии гермоплазмы.

3. Отработать методы длительного сохранения и регенерации растений – получить «искусственные семена» шлемников и разработать протоколы реинтродукции эндемичных видов.

4. Провести биохимическую оценку нативных растений шлемников и растительного материала в культуре *in vitro* на содержание флавоноидов и антиоксидантную активность.

5. Отработать методы накопления биомассы проростков в условиях *in vitro*.

Научная новизна полученных результатов. Впервые проведена комплексная разработка методов сохранения и практического использования биоразнообразия растений рода *Scutellaria* Кыргызстана методами биотехнологии. Разработаны протоколы криосохранения шлемников в генетическом банке при Институте биотехнологии НАН КР. Получены культуры *in vitro* и линии гермоплазмы. Впервые получены «искусственные семена» шлемников Кыргызстана. Проведен биохимический скрининг нативных растений и стерильных культур.

Практическая значимость полученных результатов. Заложенный на хранение в банке семян генетический материал видов рода *Scutellaria* может быть использован в дальнейших исследованиях растений этого рода. «Искусственные семена» могут быть использованы в качестве альтернативного способа сохранения и обмена ценным генетическим материалом. Отработанные методы получения и накопительного культивирования перспективных культур

шлемников *in vitro* могут внести значительный вклад в использование лекарственных свойств видов этого рода и исключить необходимость сбора растений в природе. Полученные результаты являются основой для дальнейших исследований, разработки и внедрения новых медицинских препаратов растительного происхождения в практику. Использованный в диссертации системный подход в изучении рода *Scutellaria* может быть применен в сравнительном изучении других родов дикорастущей флоры Кыргызстана.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. На примере рода *Scutellaria* разработаны биотехнологические методы получения в сравнительно короткие сроки растительного материала с целью изучения, сохранения, репродукции и практического использования дикорастущей флоры Кыргызстана.

2. Технология «искусственных семян» позволяет получать однородный растительный материал для последующего размножения и реинтродукции растений.

3. Выделение линий гермоплазмы позволяет получать культуры тканей отличимых генотипов для последующего изучения процессов накопления вторичных метаболитов в стерильных культурах.

4. Проведен скрининг нативных растений и культур *in vitro* рода *Scutellaria* по биосинтетической активности, который позволил отобрать перспективные виды шлемников и линии гермоплазмы с целью дальнейшего использования в разработке инновационных технологий для получения ценного лекарственного сырья.

Личный вклад соискателя. Основные экспериментальные исследования, описание и обобщения полученных результатов работы выполнены автором самостоятельно.

Апробация результатов диссертации. Результаты работы были доложены на международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию юбилею Т. Акматова (г. Бишкек, 2008 г.); на научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов НАН КР «Старт в Науку» (г. Бишкек, 2009 г.); на международной научной конференции «Биоразнообразие: результаты, проблемы и перспективы исследований» (г. Бишкек, 2010 г.); на международной научно-практической конференции «Перспективы развития научно-инновационной деятельности» (г. Бишкек, 2010 г.).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста и

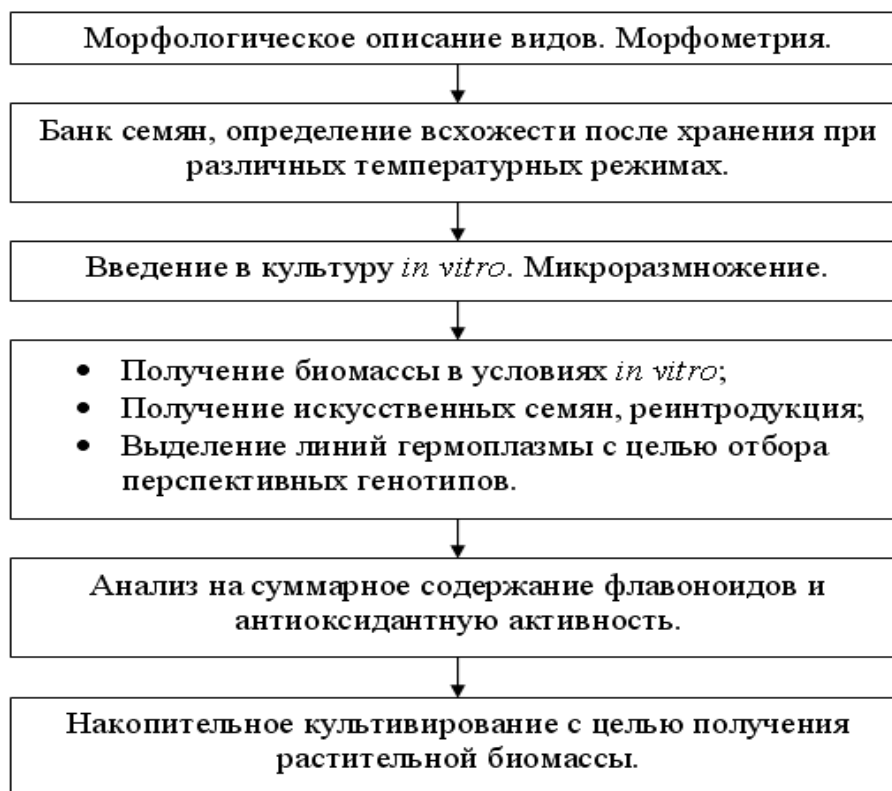
иллюстрирована 9 таблицами, 16 рисунками и одной схемой. Список цитируемых литературных источников включает 254 наименований, в том числе 199 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1. Обзор литературы.

Представлен обзор литературы о практическом значении растений рода *Scutellaria*, актуальности сохранения растительного разнообразия шлемников в условиях банков гермоплазмы. Дан анализ современных методов и подходов в области применения методов *in vitro* для получения тканевых культур с целью изучения процессов накопления вторичных метаболитов и последующего использования перспективных штаммов в качестве сырья для производства лекарственных препаратов.

Последовательность работ по сохранению, изучению и выявлению практической ценности растительного разнообразия эндемиков и хозяйственно-ценных видов шлемников методами биотехнологии можно представить в виде следующей схемы:



Глава 2. Материалы и методы исследования.

Предобработка семян и морфометрия проводились согласно общепринятым методам с учетом ключевых элементов стандартов генетических банков (Методические указания по семеноведению интродуцентов, 1980; FAO/IPGRI, 1994; Technical Information Sheet #4, 2008).

Закладка семян для хранения в криобанке проводилась при двух низкотемпературных режимах: неглубокое замораживание при -20°C и при -196°C (жидкий азот). Определение всхожести семян, заложенных на хранение в жидкий азот, проводилось после 1 месяца хранения; всхожесть семян, хранившихся при температуре -20°C , определялась после 4 месяцев хранения.

Стерилизацию семян проводили по общепринятой методике (Калинин Ф.Л. и др., 1980). Для преодоления состояния покоя семян использовался метод стратификации (Николаева М.Г. и др., 1985).

Проводили подбор питательных сред для микроразмножения (Калинин Ф.Л. и др., 1980) с добавлением фитогормонов разного типа в различных концентрациях (Умралина А.Р. и др., 2008).

Для получения искусственных семян использовался метод инкапсулирования (Redenbaugh K. et al., 1986). В качестве эксплантов служили растения не прошедшие и прошедшие холодовую закалку при $+3-5^{\circ}\text{C}$ (Adriani M. et al., 2000). Для регенерации растений проводили проращивание искусственных семян в стерильных и полустерильных условиях в почву.

Линии гермоплазмы выделялись из растений, проросших из отдельного семени. Полученные линии клонально размножались в отдельных сосудах. В процессе микроразмножения оценивался характер роста линий по 5-балльной шкале (Murch S.J. et al. 2004).

Определяли динамику накопления биомассы проростков в условиях *in vitro*. По каждому варианту измерялись сырая и воздушно-сухая биомасса и определялся ростовой индекс.

Суммарное содержание флавоноидов в нативных растениях, линиях гермоплазмы определялось спектрофотометрическим методом (Беликов В.В., 1990). Процентное содержание вычисляли по рутину-стандарту. Антиоксидантная активность определялась по методике, описанной в изобретении Максимовой Т.В. и др. (2001 г). Антиоксидантную активность выражали в мг кверцетина на г сухого вещества.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятой методике (Лакин Г.Ф., 1990). Результаты экспериментов были обработаны с помощью программы Microsoft Excel.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Описание объекта исследований.

Объектами исследований служили растения рода *Scutellaria*, произрастающие на территории Кыргызстана. Всего было изучено 15 видов, собранных из разных регионов – из них 7 видов эндемики, 1 суб-эндемик и 7 – хозяйственно-ценные виды.

Растительный материал представлен семенами и нативными растениями, которые были собраны в 2005-2010 гг. д.б.н. Г.А. Лазьковым для банка семян дикорастущей флоры Кыргызстана при Институте биотехнологии НАНКР.

Были определены морфометрические характеристики семян. После подготовки семена были заложены на хранение в банк семян при двух низкотемпературных режимах: при -20°C в морозильную камеру и при -196°C в сосуд Дьюара (жидкий азот).

3.2. Определение параметров хранения семян – всхожесть семян до и после хранения в жидком азоте и при низкотемпературном хранении (-20°C).

Для изучения влияния низких температур на жизнеспособность семян растений рода *Scutellaria* нами была определена контрольная всхожесть семян и всхожесть после хранения в жидком азоте и при -20°C пяти видов шлемника: *S. adenostegia*, *S. andrachnoides*, *S. comosa*, *S. lanipes* и *S. pycnoclada*.

Исходная всхожесть у всех видов не превышала 50%. После замораживания в жидком азоте всхожесть семян превысила контрольную у видов *S. adenostegia*, *S. pycnoclada* и *S. comosa*. Всхожесть семян *S. andrachnoides* и *S. lanipes*, прошедших замораживание в жидком азоте, осталась на уровне контрольной. Всхожесть семян после хранения при -20°C была ниже контрольной за исключением *S. adenostegia* (табл. 1).

Увеличение всхожести после замораживания в жидком азоте можно объяснить тем, что при криоконсервации и последующем оттаивании происходит разрушение семенной оболочки, которая при обычных условиях задерживает прорастание (Pritchard H.W. et al., 1988; Shibata T. et al., 1995). При хранении при -20°C некоторые метаболические процессы замедляются, и соответственно происходит медленное старение семян.

У семян был широкий диапазон периода прорастания, что может быть обусловлено географическими и экологическими условиями их формирования (Ткаченко К.Г., 1998; Воронкова Н.М. и др., 2003), видовыми особенностями, качеством и внутривидовой неоднородностью семян, а также условиями хранения при низких температурах, когда у семян происходит перестройка в типах и глубине покоя.

Результаты показывают, что наиболее высокая всхожесть наблюдается у семян, хранившихся в жидком азоте (-196°C). В то же время длительное хранение семян в этом режиме требует значительных трудовых и экономических затрат. С этой точки зрения более предпочтительным для длительного хранения представляется замораживание при -20°C , этот режим рекомендуется Международным советом ботанических садов (Laliberte V., 1997, Rao N.K. et al.; 2006).

Таблица 1 – Всхожесть семян после низкотемпературного хранения

Вид	Режим хранения	Всхожесть, %	Прорастание, дни (с-по)	Количество дней прорастания
<i>S. adenostegia</i>	Контроль	39±8	32-53	13
	-196°С	79±11 (P<0,001)	31-55	20
	-20°С	46±3 (P<0,05)	36-74	28
<i>S. andrachnoides</i>	Контроль	47	33-44	11
	-196°С	47	32-51	29
	-20°С	36	34-77	33
<i>S. comosa</i>	Контроль	36±8	32-53	24
	-196°С	38±3 (P<0,1)	31-55	45
	-20°С	13±4 (P<0,001)	39-69	26
<i>S. lanipes</i>	Контроль	50	34-46	12
	-196°С	50	33-65	32
	-20°С	30	38-70	32
<i>S. pycnoclada</i>	Контроль	49±5	30-47	14
	-196°С	73±8 (P<0,001)	31-54	16
	-20°С	37±9 (P<0,01)	33-55	19

3.3. Микроразмножение растений рода *Scutellaria*. Оптимизация питательной среды для микроразмножения. Объектом исследований являлись следующие виды: *S. adenostegia*, *S. andrachnoides*, *S. comosa*, *S. lanipes* и *S. pycnoclada*.

Для микроразмножения шлемников нами были испытаны среды Мурасиге и Скуга (MS, Murashige T. and Skoog F., 1962) и Гамборга (B5, Gamborg O.L., 1968) с добавлением фитогормонов в различных концентрациях и сочетаниях.

Мериклоны всех видов шлемников образуют хорошо выраженные междоузлия, поэтому для их размножения мы применяли метод микрочеренкования.

При культивировании на среде MS лучше всех испытываемых шлемников развивались растения *S. andrachnoides*. На среде MS без фитогормонов черенки этого вида укоренялись, но формировались тонкие побеги. На среде MS с добавлением 1,0 мг/л ИУК побеги образовывались хорошие, все укоренялись,

формировался каллус. При добавлении 1,0 мг/л ИМК образовывались мощные пучки светлых корней, также в месте соприкосновения стебля со средой формировался каллус. Сравнение фитогормонов ауксинового типа ИУК и ИМК показало, что наиболее эффективным в условиях *in vitro* является гормон ИМК.

Влияние веществ цитокининового типа – БАП (0,1мг/л) и кинетина (0,1мг/л) изучалось только со средой MS. На средах с гормонами цитокининового типа – БАП (0,1мг/л) и кинетином (0,1мг/л) черенки не давали корней, но на них кроме основных побегов образовывалось много дополнительных в вариантах с БАП более 10 на черенок, в вариантах с кинетином по 5-6 побегов. Последующее культивирование их на среде В5, содержащей 0,25мг/л ИМК, обеспечивало высокий процент укоренившихся растений. Такое двухэтапное выращивание предлагается применять при необходимости ускоренного микроразмножения уникальных генотипов шлемника.

Растения *S. lanipes* оказались более чувствительными к среде MS. На среде без гормонов формировались более тонкие побеги, каллус не образовывался. На среде с 1,0 мг/л ИМК побеги удлинялись и укоренялись, формировался каллус, который затем темнел.

Наиболее чувствительными к среде MS были растения видов *S. adenostegia*, *S. comosa* и *S. pycnoclada*. Рост черенков этих видов и формирование корней на среде MS без фитогормонов не наблюдался. Формировалась значительная масса каллуса. Добавление 1,0 мг/л ИМК индуцировало слабое удлинение стеблей и корней, формировался каллус.

На среде В5 без фитогормонов черенки всех пяти видов хорошо развивались, но формирование корней было слабое. Добавление 1,0 мг/л ИМК способствовало удлинению побегов и росту корней, а также образованию каллуса. Дальнейшее снижение концентрации ИМК (0,5 мг/л и 0,25 мг/л) сохраняло характер роста органов и снижало образование каллуса. Наиболее оптимальной оказалась концентрация 0,25 мг/л, при которой наблюдался энергичный рост стеблей и корней и наименее выраженное образование каллуса.

Результаты наших исследований показывают, что все испытанные виды шлемников могут успешно размножаться в культуре *in vitro*. Наиболее оптимальной для культивирования растений рода *Scutellaria* в условиях *in vitro* оказалась среда В5 с добавлением 0,25 г/л ИМК.

3.4. Получение «искусственных семян» растений рода *Scutellaria*

Нами были получены искусственные семена шлемников *S. adenostegia*, *S. andrachnoides*, *S. comosa*, *S. lanipes*, и *S. pycnoclada*. Был проведен эксперимент по определению влияния холодной заделки на выживаемость искусственных

семян. После 1 и 2 месяцев хранения искусственных семян, полученных от растений, не прошедших холодовую закалку, образования побегов не наблюдалось ни у одного из пяти видов. Искусственные семена практически полностью развивались в каллус (рис. 1).

Холодовая закалка растений в течение короткого периода (до 6 недель) значительно повышает выживаемость меристем (Stushnoff C., 1987; Brison M. et al., 1995). В нашем опыте образование побегов в контроле у искусственных семян из растений, прошедших холодовую закалку, превышает 50% у видов *S. comosa*, *S. lanipes* и *S. ruscoclada*, а у *S. andrachnoides* побеги дали все искусственные семена (рис. 2).

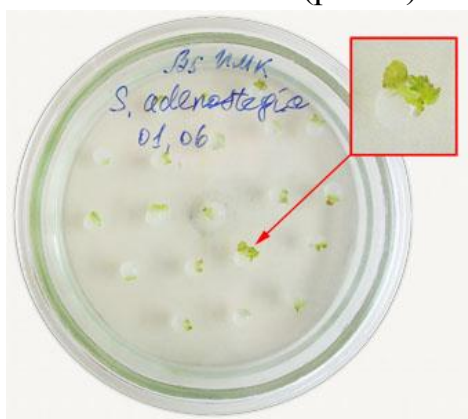


Рис. 1. Образование каллуса у искусственных семян *S. adenostegia*, полученных от эксплантов, не прошедших холодовую закалку



Рис. 2. Побеги искусственных семян, полученных от эксплантов *S. andrachnoides*, прошедших холодовую закалку

Жизнеспособность искусственных семян, хранящихся при низкой температуре, проверялась каждый месяц и оставалась высокой, но в период от 4 до 5 месяцев хранения у них началось формирование этиолированных побегов с редуцированными листьями и корней. После высаживания этих побегов в камере на свету, все они развились в здоровые зеленые растения с развитыми корнями.

Был проведен опыт по высаживанию искусственных семян в полустерильные условия в почву для получения полноценных растений. Посадка в почву незащищенных семян *S. andrachnoides* и *S. lanipes* окончилась неудачей, все они заразились и погибли. Мы нанесли второй, защитный слой на искусственные семена перед высаживанием их в почву. При этом была использована среда на основе 100 мл 3% раствора альгината на среде В-5 без гормонов и в нее внесены 150 мг фундазола и 100 мг клафорана. Семена были высажены в горшочки с простерилизованной почвой, смешанной с песком. Растения хорошо развивались в горшочках на почвенном субстрате.

В результате наших исследований были разработаны протоколы получения «искусственных семян» растений рода *Scutellaria*. Для двух эндемиков *S. andrachnoides* и *S. lanipes* разработаны протоколы для последующего перевода искусственных семян в полустерильные условия в почву. Искусственные семена являются удобной формой для хранения генетического материала растений, обмена растительным материалом в научных целях, а также перспективны для реинтродукции эндемиков и редких видов в естественные природные условия.

3.5. Выделение линий гермоплазмы растений рода *Scutellaria*. Объектами исследования служили два вида шлемников: *S. andrachnoides* и *S. lanipes*. Каждая линия гермоплазмы выделялась из растения, полученного от отдельного семени при введении в культуру *in vitro*.

У *S. andrachnoides* было получено 14 линий, у *S. lanipes* – 21 линия. Полученные линии поддерживались в культуре клональным микроразмножением.

При каждом пассаже визуально оценивались скорость и характер роста линий по 5-бальной шкале. Наиболее быстрорастущими линиями *S. andrachnoides* являлись линии Sa-1, Sa-2, Sa-7 и Sa-11, оцененные в 5 баллов, наиболее медленно растущими – Sa-4 и Sa-13, имевшие 2 и 1 балл соответственно (рис. 3а). Остальные линии имели среднюю скорость роста.

5-бальную скорость роста линий *S. lanipes* имели Sl-2 и Sl-5. Линии Sl-3, Sl-6, Sl-13, Sl-15, Sl-16, Sl-17, Sl-20 имели среднюю скорость роста (рис. 3б). Худшие ростовые характеристики имели две линии Sl-8 и Sl-18.

Проростки размножались в культуре для накопления растительного материала с целью последующего проведения анализов на антиоксидантную активность и содержание флавоноидов.

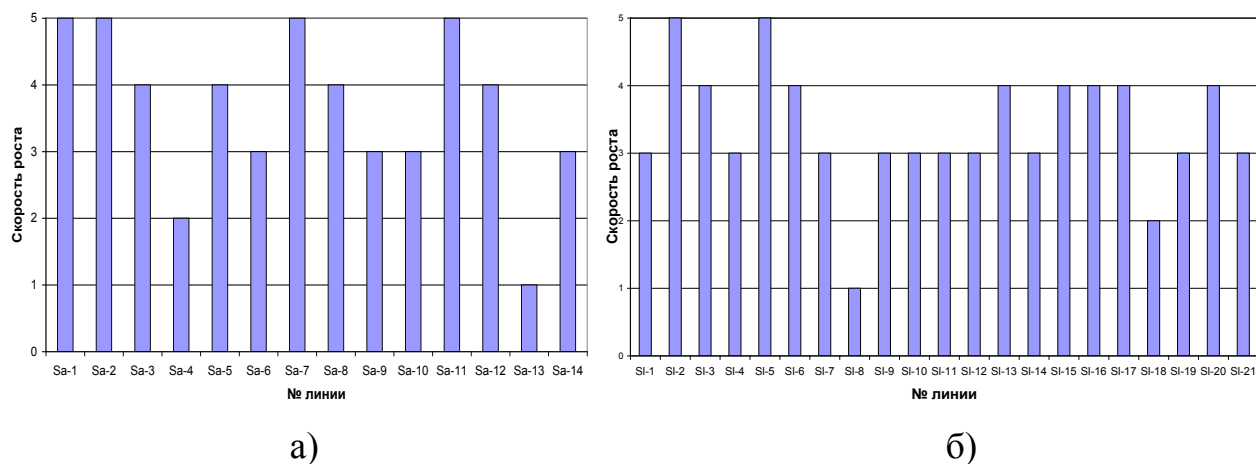


Рис. 3. Скорость роста линий гермоплазмы *S. andrachnoides* (а) и *S. lanipes* (б)

3.6. Проведение сравнительного биохимического тестирования культур *in planta* и *in vitro* на содержание флавоноидов и антиоксидантную активность.

3.6.1. Содержание флавоноидов и антиоксидантная активность нативных растений шлемников Кыргызстана. Для сравнительного исследования был проведен анализ нативного растительного материала рода *Scutellaria* Кыргызстана (рис. 4).

Как показали полученные данные антиоксидантная активность в той или иной степени коррелирует с количеством флавоноидов в растениях. Так, с увеличением содержания флавоноидов в тканях наблюдается повышение относительной антиоксидантной активности. Отдельные различия этих величин, возможно, заключаются в том, что антиоксидантную активность обуславливают и другие физиологически активные соединения.

Сопоставление полученных результатов относительной антиоксидантной активности и суммы флавоноидов нативных растений рода *Scutellaria* позволяет выделить ряд перспективных для дальнейшего изучения видов – *S.knorringiae*, *S. nepetoides*, *S. oligodonta*, *S. mesostegia*, *S. transilensis*.

3.6.2. Содержание флавоноидов и антиоксидантная активность растений шлемников *in vitro*. После накопления достаточного количества растительного материала *in vitro*, было проведено сравнительное исследование содержания флавоноидов и антиоксидантной активности в нативных растениях и полученных методом *in vitro* 5 видов шлемников (табл. 2).

Таблица 2 – Антиоксидантная активность и сумма флавоноидов нативных растений и растений *in vitro* рода *Scutellaria*

Вид	Часть растения	<i>In vitro</i>		Нативные растения	
		сумма флавоноидов, %	АОА, мг кверцетина/г сухого в-ва	сумма флавоноидов, %	АОА, мг кверцетина/г сухого в-ва
<i>S. adenostegia</i>	надземная часть	1,28±0,02 (P<0,05)	20,62±0,75 (P<0,05)	2,90±0,02	27,26±0,69
	корни	1,19±0,01 (P<0,01)	32,68±1,23 (P<0,05)	2,15±0,04	24,74±3,82
<i>S. andrachnoides</i>	надземная часть	0,55±0,02 (P<0,01)	17,74±0,23 (P<0,01)	0,72±0,02	23,6±1,95
	корни	0,57±0,01 (P<0,001)	35,44±1,05 (P<0,01)	2,74±0,05	29,6±1,48
<i>S. pycnoclada</i>	надземная часть	0,90±0,01 (P<0,1)	19,32±0,98 (P<0,05)	3,57±0,04	37,24±2,70
	корни	0,72±0,1 (P<0,05)	20,50±0,28 (P<0,01)	1,79±0,02	30,81±1,84
<i>S. comosa</i>	надземная часть	0,83±0,01 (P<0,001)	19,54±0,54 (P<0,01)	4,31±0,23	41,92±2,63
<i>S. lanipes</i>	надземная часть	0,54±0,01	19,43±1,56	2,18	-

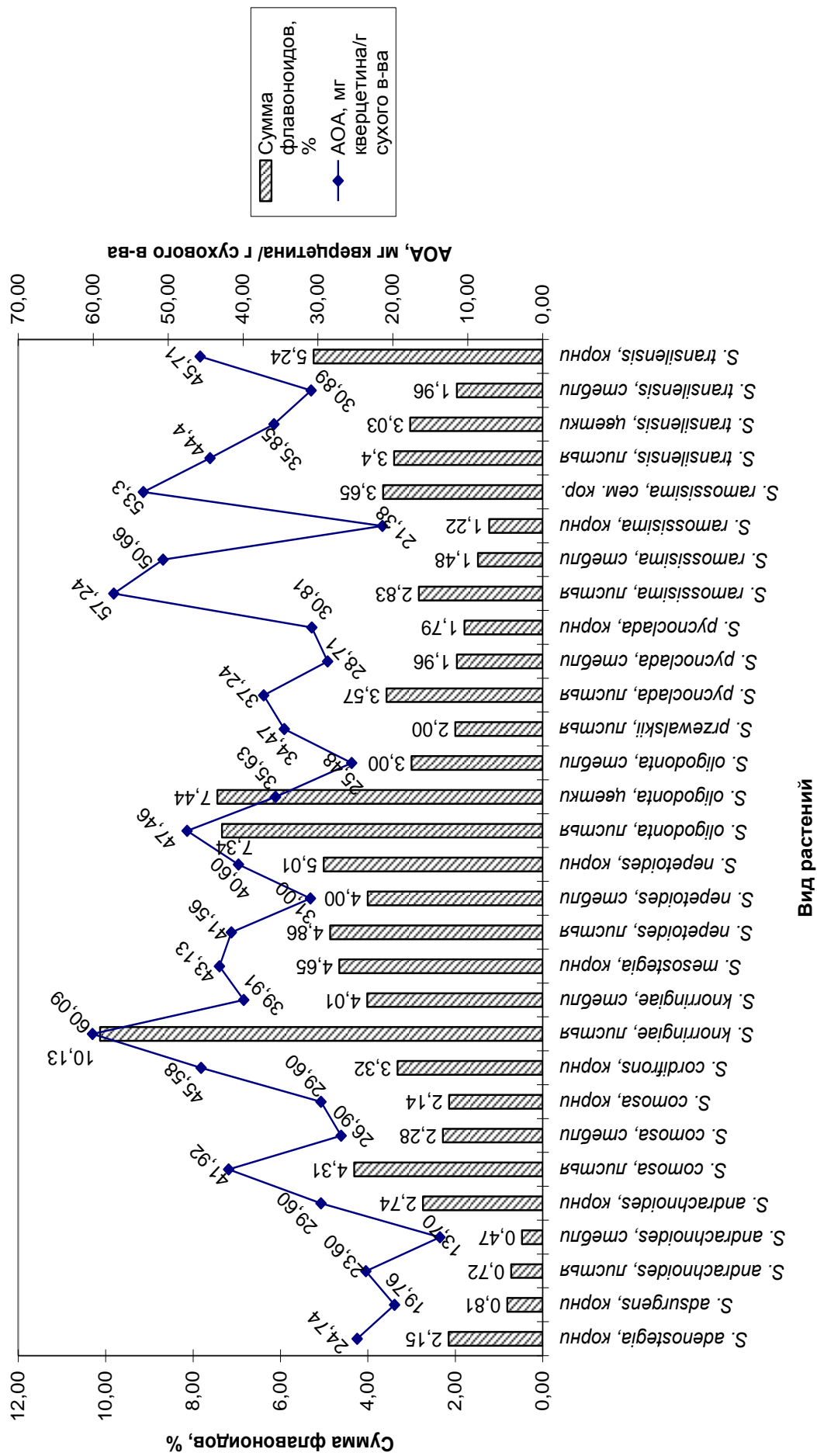


Рис. 4. Сумма флавоноидов и антиоксидантная активность нативных растений рода *Scutellaria* Кыргызстана

Содержание флавоноидов и антиоксидантная активность нативных растений были выше, чем стерильных проростков. Несмотря на это, преимущество применения методов *in vitro* заключается в том, что с помощью микроразмножения можно получать растительный материал в короткие сроки, тем самым исключая необходимость сбора растений в природе.

3.6.3. Содержание флавоноидов и антиоксидантная активность линий гермоплазмы растений рода *Scutellaria*. Было проведено сравнение линий гермоплазмы видов *S. andrachnoides* и *S. lanipes*. Маркерами служили скорость роста, суммарное содержание флавоноидов и антиоксидантная активность. Для сравнения продуктивности линии были сгруппированы по ростовым характеристикам.

Линии гермоплазмы обоих видов имели заметные различия по всем параметрам. У линий *S. andrachnoides* самые низкие показатели имела линия Sa-4. Наиболее интересной представляется линия Sa-14, имеющая при высокой концентрации флавоноидов и высокий антиоксидантный потенциал, как в надземной части, так и в корнях (рис. 5).

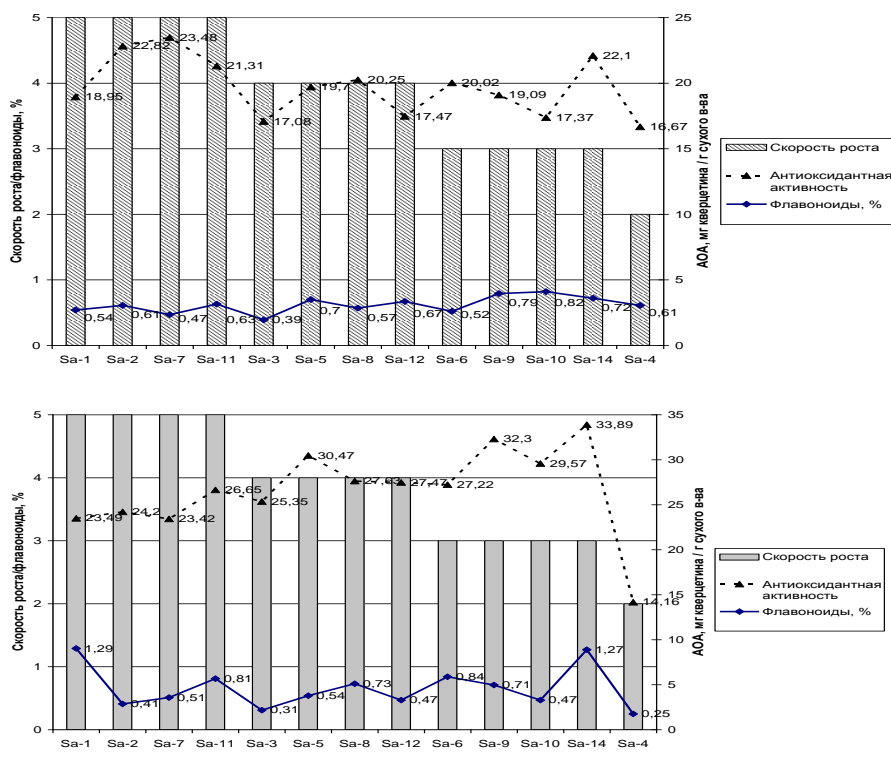
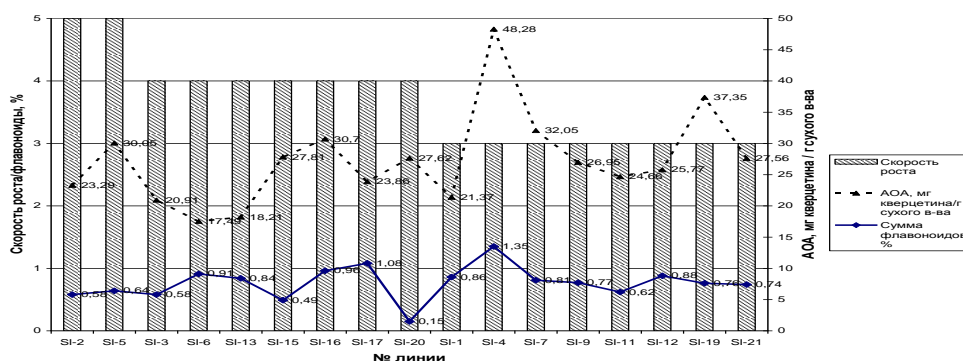


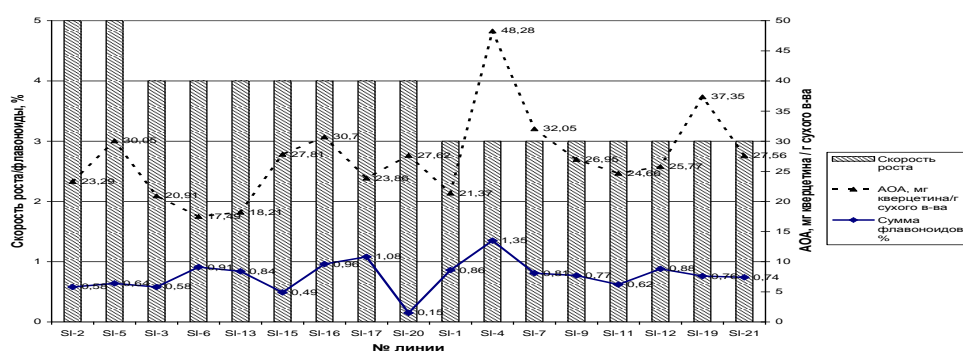
Рис. 5. Антиоксидантная активность и суммарное содержание флавоноидов в надземной части (а) и корнях (б) линий *S. andrachnoides*

У *S. lanipes* наиболее высокие показатели содержания флавоноидов и антиоксидантной активности надземной части были у линии Sl-1, в корнях у линий Sl-11 и Sl-15 (рис. 6).

В целом корни линий обоих видов имели более высокие показатели содержания флавоноидов и антиоксидантной активности по сравнению с надземной частью.



а)



б)

Рис. 6. Антиоксидантная активность и суммарное содержание флавоноидов в надземной части (а) и корнях (б) *S. lanipes*

Определенной зависимости биохимических характеристик от скорости роста не наблюдается, во всех группах есть линии, накапливающие как высокие, так и низкие концентрации флавоноидов и имеющие различную антиоксидантную активность.

Таким образом, в результате наших исследований были получены линии гермоплазмы двух видов шлемников, отличающиеся по своим морфологическим и биохимическим характеристикам. Отбор линий гермоплазмы является одним из этапов в получении культур, в которых содержание вторичных продуктов достаточно велико, чтобы служить основой для получения лекарственного сырья.

3.7. Накопление биомассы проростков в условиях *in vitro*.

Для получения достаточного количества биомассы с целью получения биоактивных вторичных соединений используется метод накопительного культивирования. С этой целью был проведен эксперимент по определению динамики накопления биомассы в культуре *in vitro* вида *S. comosa*.

В первую неделю после посадки растения находились в лаг-фазе, а, начиная со второй недели, переходили в фазу экспоненциального роста (рис. 7). К 6-й неделе растения переходят в фазу замедления роста. К этому моменту растения достигают наиболее высокого ростового индекса, который составляет $15,0 \pm 3,0$ ($P < 0,01$) (табл. 3).

Данные опыта показывают, что накопление биомассы в наблюдаемый период времени не имеет экспоненциальный характер в отличие от роста растений, что подтверждается наложением на график накопления биомассы линии тренда степенного типа (рис. 8).

Таблица 3 – Индекс накопления биомассы растений вида *S. comosa*

Возраст культуры, неделя	1	2	3	4	5	6
Индекс накопления биомассы	$2,5 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,6$ ($P < 0,01$)	$7,1 \pm 0,3$ ($P < 0,001$)	$11,1 \pm 0,3$ ($P < 0,001$)	$12,4 \pm 2,7$ ($P < 0,01$)	$15,0 \pm 3,0$ ($P < 0,01$)

После измерения сырой массы растения были высушены и была подсчитана воздушно-сухая масса растений (табл. 4).

В первые две недели роста процент воздушно-сухой массы оставался на относительно неизменном уровне – 8,8-9,0%, начиная с 3-й недели он начал повышаться, и к 5-6 неделе достиг уровня 9,8-9,9%, что на 1,0-1,1% выше по сравнению с первоначальным значением. По-видимому, разница в процентном содержании воздушно-сухого вещества объясняется тем, что при посадке эксплантов на новый субстрат они входят в лаг-фазу адаптации к новой среде, когда происходит перестройка в обмене веществ и клетки вакуолизированы в большей степени.

Таким образом, исследование динамики роста культуры *in vitro* на примере вида *S. comosa* показало, что при культивировании на агаризованной среде растения к 6-й неделе истощают субстрат и достигают наибольшего ростового индекса и входят в стадию, оптимальную для пересаживания на свежую питательную среду.

Проведенная работа по изучению накопления биомассы в условиях *in vitro* предоставляет возможность получения селективного растительного материала в короткие сроки для его последующего изучения. Главной целью таких биотехнологий является получение растительной биомассы, выращенной в контролируемых условиях.

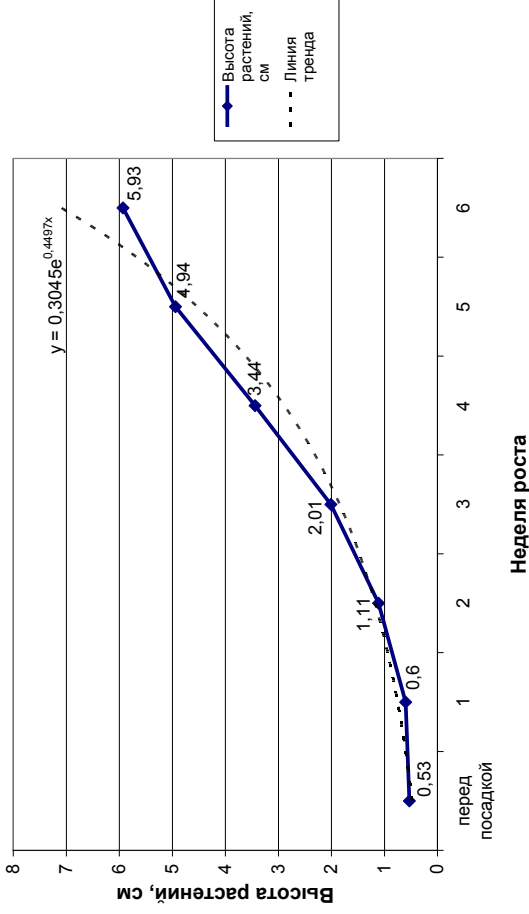


Рис. 7. График роста растений *S. comosa*, см

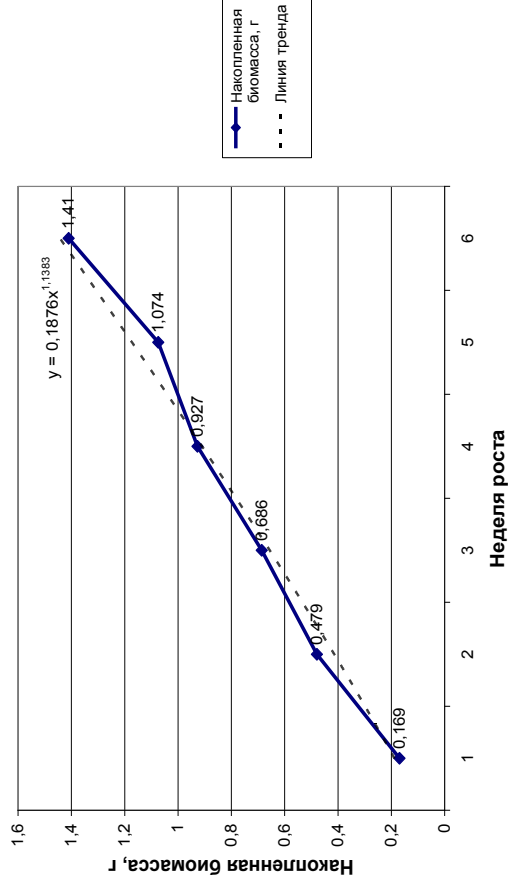


Рис. 8. График накопления биомассы растений *S. comosa*, г

Таблица 4 – Сырая и воздушно-сухая масса растений вида *S. comosa*, г

Возраст культуры, неделя																	
1			2			3			4			5			6		
сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва	сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва	сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва	сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва	сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва	сырая масса	возд.-сух. масса	% сухого в-ва
0,286	0,025	8,8	0,607	0,055	9,0	0,800	0,075	9,5	1,018	0,099	9,9	1,170	0,114	9,8	1,514	0,150	9,9
±0,056	±0,007	±0,7	±0,155	±0,015	±0,1	±0,431	±0,039	±0,4	±0,324	±0,026	±0,8	±0,113	±0,007	±0,4	±0,284	±0,030	±0,1

ВЫВОДЫ

1. С целью сохранения в семенном банке растений рода *Scutellaria* разработаны протоколы криосохранения семян при двух низкотемпературных условиях (-20°C и в жидком азоте при - 196 °C).

2. Разработан метод ускоренного микроразмножения уникальных генотипов шлемника, включающий двухэтапное выращивание. На первом этапе растения культивируются на среде Мурасиге и Скуга с гормонами цитокининового типа, на втором этапе экспланты пересаживаются на среду Гамборга с гормонами ауксинового типа. Получены линии гермоплазмы двух эндемичных видов *S. andrachnoides* и *S. lanipes*, отличающиеся по своим морфологическим и биохимическим характеристикам.

3. Впервые разработаны протоколы получения «искусственных семян» шлемников, а также перевода эндемичных видов *S. andrachnoides* и *S. lanipes* в полустерильные условия в почву, что является эффективным альтернативным методом сохранения генетического разнообразия и размножения эндемиков, редких и коммерчески ценных видов.

4.. Проведена биохимическая оценка нативных растений и линий гермоплазмы шлемников на содержание флавоноидов и антиоксидантную активность. Выделены перспективные виды шлемников для дальнейшего изучения. Линии гермоплазмы, имеющие среднюю скорость роста, имеют более высокие концентрации флавоноидов и антиоксидантную активность. Отбор линий гермоплазмы по биологическим тестам является одним из этапов в получении культур, в которых содержание вторичных продуктов достаточно велико, чтобы служить лекарственным сырьем.

5. Определена динамика накопления биомассы шлемников в культуре *in vitro* на примере вида *S. comosa*. При культивировании растения, начиная со 2-й недели, входят в фазу экспоненциального роста и к 6-й неделе истощают субстрат и входят в фазу замедления роста. За это время достигается 15-ти кратное увеличение биомассы.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Создание банка долговременного хранения семян эндемичных, редких и хозяйственно ценных видов на примере растений рода *Scutellaria* [Текст] / [Т.П. Чернышева, Г.П. Пиндюрина, Б.А. Асанакунов и др.] // Вестник КАУ. – 2008. – №3(11). – С. 116-119.
2. Асанакунов Б.А. Влияние низкотемпературных режимов хранения на всхожесть семян растений рода *Scutellaria* [Текст] / Б.А. Асанакунов // Сб. материалов межд. конф. «Биосферные территории Центральной Азии как природное наследие», г. Чолпон-Ата, 2009 г. – С. 160-162.
3. Асанакунов Б.А. Накопление биомассы растений вида *Scutellaria comosa* в условиях стерильной культуры *in vitro* [Текст] / Б.А. Асанакунов // Вестник КАУ. – 2009. – №4(15). – С. 36-39.
4. Асанакунов Б.А. Применение низкотемпературного замораживания для долговременного хранения семян дикорастущей флоры Кыргызстана на примере растений рода *Scutellaria* [Текст] / Старт в науку. Материалы научно-практ. конф. – Бишкек, 2009 г. – С. 8-9.
5. Флавоноиды и антиоксидантная активность некоторых растений рода *Scutellaria* [Текст] / [Б.А. Асанакунов, И.В. Бабченко, Р.А. Алфимова и др.] // Вестник КГУ им. Арабаева. – 2010. – Вып. 17. – С. 139-145.
6. Асанакунов Б.А. Получение искусственных семян растений рода *Scutellaria* методом инкапсулирования [Текст] / Б.А. Асанакунов // Вестник КазНУ им. Аль-Фараби. Серия Биологическая – 2011. – №1(47). – С. 15-18.
7. Поддержание в контролируемых условиях (*in vitro*) ювенильных растений как способ сохранения эндемиков и редких видов растений Кыргызстана и возможности их использования для биотехнологических разработок [Текст] / [А.Р. Умралина, Т.П. Чернышева, Б.А. Асанакунов и др.] // Инновационные биотехнологии в странах ЕвразЭС. Материалы Межд. научно-практ. конф. – Минск, 2011 г. С. 90-104.
8. Выделение линий гермоплазмы растений рода *Scutellaria* [Текст] / [Т.П. Чернышева, И.В. Бабченко, Б.А. Асанакунов и др.] // Известия НАН КР. – 2011. – №3. – С. 65-68.

**Асанакунов Бактыбек Ашымовичтин биология илиминин кандидаты
деген даражаны адистиги 03.01.06 – биотехнология, жактоо үчүн
«Өсүмдүктөрдүн Scutellaria тукумунун биотехнологиясы» деген темада
жазылган диссертациясынын**

КОРУТУНДУСУ

Түйүндүү сөздөр: Scutellaria, биоартүрдүлүк, эндемиктер, *in vitro* өстүрүү, жасалма урук, флавоноиддер.

Изилдөөнүн объектиси: Кыргызстандын аймагында өскөн өсүмдүк Scutellaria тукумунун 15 түрү. Алардын ичинен 7 – эндемиктер, 7 – чарбалык баалуу түрлөр жана 1 – суб-эндемик.

Изилдөөнүн максаты: иштин максаты – *ex situ*-ни сактоо үчүн биотехнологиялык ыкмаларды иштеп чыгуу жана Кыргызстан флорасында жапайы өскөн өсүмдүк Scutellaria тукумунан мүмкүнчүлүктү булак болгон дарылык чийки зат өндүрүү үчүн биологиялык потенциалды изилдөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: морфометриялык, биотехнологиялык, биохимиялык жана статистикалык.

Алынган жыйынтыктар жана алардын жаңылыктары: алгачкы жолу Кыргызстанда биотехнологиялык ыкмалар менен Scutellaria тукумунун биоартүрдүүлүгүн практикада пайдалануу жана сактап калуу ыкмалары менен практикалык бирдиктүү иш жүргүзүлдү. УИАнын биотехнология институтунун генетикалык банкында шлемниктердин криосакталышынын ыкмалары иштелип чыкты. *In vitro* өстүрүү жана гермоплазма линиясы алынды. Кыргызстанда биринчи жолу шлемниктердин «жасалма уруктары» алынды. Кадимки өсүмдүктөргө жана тазартылган культураларга биохимиялык скрининг жүргүзүлдү.

Практикалык мааниси: банкта сактала турган Scutellaria тукумунун генетикалык материалы болгон уругу, келечектеги илимий-изилдөөдө колдонушу мүмүн. «Жасалма урук» баалуу генетикалык материал жана альтернативтүү сапаттагы сактоонун ыгы болот. Иштелип чыккан культуралык ыкма *in vitro* шлемниктен келечекте дары препаратын өндүрүүдө чийки зат катары негизги курал болуп эсептелет. Диссертацияда колдонулган Scutellaria тукумун изилдөөдө алынган систематикалык ыкма, Кыргызстанда жапайы өскөн өсүмдүктөрдүн башка тукумдарын салыштырып изилдөөдө колдонушу мүмкүн.

Пайдалануу чөйрөсү: алынган жыйынтыктар өсүмдүктөрдүн ар-түрдүүлүгүн сактап калууда жана өсүмдүк байлыктарын практикада колдонуу максатында пайдаланышы мүмкүн.

РЕЗЮМЕ

диссертации Асанакунова Бактыбека Ашымовича на тему
«Биотехнология растений рода *Scutellaria*», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 –
биотехнология

Ключевые слова: *Scutellaria*, биоразнообразии, эндемик, культура *in vitro*, искусственные семена, флавоноид.

Объекты исследования: 15 видов растений рода *Scutellaria*, произрастающие на территории Кыргызстана. Из них 7 – эндемики, 7 – хозяйственно-ценные виды и 1 суб-эндемик.

Цель исследований: отработать биотехнологические методы с целью сохранения *ex situ* и изучения биологического потенциала растений рода *Scutellaria* дикорастущей флоры Кыргызстана как возможного источника лекарственного сырья.

Методы исследования: морфометрические, биотехнологические, биохимические, статистические.

Полученные результаты и их новизна: впервые проведена комплексная разработка методов сохранения и практического использования биоразнообразия растений рода *Scutellaria* Кыргызстана методами биотехнологии. Разработаны протоколы криосохранения шлемников в генетическом банке при Институте биотехнологии НАН КР. Получены культуры *in vitro* и линии гермоплазмы. Впервые получены «искусственные семена» шлемников Кыргызстана. Проведен биохимический скрининг нативных растений и стерильных культур.

Практическая значимость: Заложенный на хранение в банке семян генетический материал видов рода *Scutellaria* может быть использован в дальнейших исследованиях растений этого рода. «Искусственные семена» могут быть использованы в качестве альтернативного способа сохранения и обмена ценным генетическим материалом. Отработанные методы культивирования перспективных тканевых культур *in vitro* шлемников послужат инструментом в поиске сырья для лекарственных препаратов. Использованный в диссертации системный подход в изучении рода *Scutellaria* может быть использован в сравнительном изучении других родов дикорастущей флоры Кыргызстана.

Область применения: полученные результаты могут быть использованы для сохранения растительного разнообразия и практического использования растительных ресурсов.

SUMMARY

to dissertation of Baktybek Ashymovich on theme "Biodiversity preservation and practical use of Scutellaria genus plant species by biotechnological methods" presented of competition of academic degree of candidate of biological sciences on specialty 03.01.06 - biotechnology

Key words: Scutellaria, biodiversity, endemic, *in vitro* culture, artificial seeds, flavonoid.

Object of research: 15 Scutellaria genus plant species growing in Kyrgyzstan. 7 of them are endemics, 7 are economically valuable species and 1 is sub-endemic.

Goal of research: to work out biotechnological methods for *ex situ* preservation and studying the biological potential of the Scutellaria plant species of Kyrgyzstan wild flora as the possible medicinal crude source.

Methods of research: morphometric, biotechnological, biochemical, statistical.

Obtained results and their novelty: complex development of the preservation methods and practical use of the Scutellaria plant species biodiversity by biotechnology methods was carried out for the first time. Protocols of skullcap cryopreservation in the genetic bank of the Biotechnology Institute of NAS KR were developed. *In vitro* cultures and germplasm lines were produced. Artificial seeds of Kyrgyzstan skullcaps were produced for the first time. Biochemical screening of native plants and sterile cultures was carried out.

Practical value: Scutellaria genus species genetic material put into the seed bank for conservation can be used in the further studies of this genus species. "Artificial seeds" can be utilized as alternative mean of preservation and valuable genetic material exchange. Worked out cultivation methods of perspective skullcap *in vitro* cultures can serve is instrument in searching of crude for medical products. Used in the thesis systematic approach in Scutellaria genus study can be used in comparative study of other genera of Kyrgyzstan wild flora.

Field of application: obtained results can be used for plant diversity preservation and practical utilization of plant resources.