

ПУШКАРЬОВА Н.О.✉, БЕЛОКУРОВА В.Б., КУЧУК М.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 146, e-mail: pushkarovan@mail.ua
✉ pushkarovan@mail.ua, (093) 773-33-60

ВИВЧЕННЯ ДЕЯКИХ БІОХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ВИДІВ РОСЛИН, ЩО ОХОРОНЯЮТЬСЯ, В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Динаміка руйнівних процесів, що призводять до постійного скорочення біорізноманіття (непродумане землекористування, заміна місцевих екосистем сільськогосподарськими угіддями та людськими поселеннями тощо), не знижується, тому для сповільнення темпів скорочення біорізноманіття та відновлення чисельності видів потрібен масштабний, міжгалузевий підхід. На сьогодні розрізняють два основні підходи до збереження різноманіття рослинного світу: *in situ* (збереження видів у природних умовах) та *ex situ* (збереження в контрольованих умовах – банках генів, ботанічних садах, за допомогою кріоконсервації). Кожен із підходів є досить результативним та має ряд переваг.

До Червоної книги України входить багато видів рослин, що можуть бути використані як цінний матеріал сільськогосподарського та промислового значення, але, на жаль, дослідження таких видів утруднюється через низьку чисельність популяцій. Водночас застосування до таких рослин методів біотехнології, зокрема культивування *in vitro*, дає змогу отримати високий коефіцієнт розмноження навіть для видів, що погано піддаються розмноженню *in situ* та *ex situ* [1], і забезпечити потрібною кількістю біомаси для всебічного вивчення видів рослин, що зберігаються. Отже, створення *in vitro* колекцій видів флори України, що охороняються, є важливим та актуальним завданням і не лише може зробити суттєвий внесок у природоохоронну роботу, а, можливо, поповнити списки рослин, які синтезують важливі біохімічні сполуки (зокрема, антиоксиданти, поліцукри тощо) або є цінним генетичним матеріалом.

Відомо, що антиоксиданти нейтралізують вільні радикали, що виникають в результаті окислювальних процесів, які відбуваються в клітині живого організму і здатні атакувати життєво важливі мішені. Для підсилення можливостей природних механізмів антиоксидантного захисту використовуються лікарські засоби, що мають високу антиоксидантну активність [2]. Фруктани

– це полімери D-фруктози, які проявляють імуномодельюючу, протипухлинну та протизапальну активність, тому рослини, що мають високий вміст поліфруктанів, також потенційно можуть бути використані в фармакології. Дослідження антиоксидантної активності (АОА) екстрактів рослин та кількісного вмісту поліфруктанів дає змогу виявити потенційні джерела речовин із біологічною активністю. Метою цієї роботи було вивчення деяких біохімічних показників рослин, що занесені до Червоної книги України. Оскільки використані види потребують заходів щодо збереження, можливості їх вивчення обмежуються недоступністю або низькою чисельністю в природі. Тому для проведення досліджень було використано рослинний матеріал, розмножений за допомогою методів культури *in vitro*.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. В Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ створена та постійно поповнюється унікальна колекція рослин *in vitro*, в тому числі таких, що охороняються. В нашій роботі було використано ряд видів дикорослої флори України, які належать до різних таксономічних груп та мають різний природоохоронний статус (табл. 1) [3]. Рослини вирощували на агаризованому живильному серед-

Таблиця 1

Природоохоронний статус видів, що були використані в дослідженні

Родина	Вид	Природоохоронний статус
Asteraceae	<i>Ligularia sibirica</i> (L.) Cass	Вразливий
	<i>Leontopodium alpinum</i> Cass.	Зникаючий
Brassicaceae	<i>Crambe tataria</i> Sebeók	Вразливий
Fabaceae	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L	Неоцінений
Iridaceae	<i>Iris sibirica</i> L.	Вразливий

овищі Мурасіге-Скуга (MS) при 16-годинному фотоперіоді і температурі +24°C за розробленими раніше методиками з регулярними субкультивуваннями раз на 30 діб [1].

Приготування екстрактів та їх біохімічний аналіз. Для приготування екстрактів зважували 200 мг рослинного матеріалу (верхівкове листя), гомогенізували у 0,6 мл дистильованої води, центрифугували при 10000 g протягом 10 хв. Для визначення поліфруктанів відбирали 100 мкл супернатанту, до якого додавали 100 мкл 0,1 % спиртового розчину резорцину та 100 мкл концентрованої соляної кислоти. Екстрагування проводили на водяній бані при температурі +80°C протягом 20 хв. Вміст поліфруктанів вивчали за методом Селіванова [5] на спектрофотометрі Erppendorf (550 нм), концентрацію визначали за калібрувальним графіком (за фруктозою). Визначення вмісту білка в екстрактах проводили за методом Бредфорда [5]. Антиоксиданту активність визначали за DPPH-методом [7]. Аскорбінова кислота в концентрації 1 мг/мл була використана в якості еталонного стандарту.

Результати та обговорення

Оскільки представники родів *Ligularia*, *Iris* та *Leontopodium* є джерелом великої кількості біологічно активних речовин, багато з яких мають протеїнову природу [7], ми очікували отримати високий вміст білка в екстрактах дослідних видів цих родів. Високий середній вміст білка було підтверджено для *L. alpinum* ($9,3 \pm 0,66$ мг/г) (табл. 2). Дещо нижчі показники спостерігалися в екстрактах *L. sibirica* ($6,6 \pm 0,59$ мг/г) та *I. sibirica* ($7,6 \pm 2,02$ мг/г). Для *C. tataria* вміст білка ста-

новив $4,9 \pm 0,10$ мг/г маси, що збігається із попередніми дослідженнями родини Brassicaceae (вміст білка до 4,8 мг/г сирової ваги для броколі) [8]. Серед усіх дослідних видів найвищий вміст загального розчинного білка виявили в екстракті *G. glabra* ($12,7 \pm 4,15$ мг/г), що корелює з дослідженнями щодо цього виду інших авторів [9].

Визначена за відновленням дифенілпікрилгидрозилрадикалу АОА екстрактів із листя дослідних видів виявилася досить високою та в деяких випадках навіть досягала показників АОА аскорбінової кислоти, використаної в якості стандарту. Так, АОА для *C. tataria* становила 100 % (табл. 2), що відповідає даним ряду публікацій [10, 11]. Для *L. sibirica* також була встановлена досить висока АОА (77,6 %), що підтверджується даними з наукових літературних джерел про високу активність елементів системи антиоксидантної активності [12]. Антиоксидантна активність екстрактів *G. glabra* (73,1 %) була вищою від зазначеної в наукових літературних джерелах [13, 14]. Найнижчі показники АОА показали екстракти *L. alpinum* – 65,1 %.

Згідно з опрацьованими нами науковими літературними джерелами, представники родини Brassicaceae в природних умовах накопичують фруктовмісні цукри по-різному: від 0,10 мг/г (для *Nasturtium officinale*) до 6,10 мг/г (для *Brassica oleracea* var. *capitata*) сирової ваги [8]. Рослини виду *C. tataria*, вирощені в умовах *in vitro*, містили $8,7 \pm 3,98$ мг/г фруктозовмісних цукрів, що перевищувало вміст цих речовин у найбільш вживаних до їжі представників родини. Найвищий вміст поліфруктанів (ПФ) серед дослідних рослин був виявлений у *I. sibirica* – $16,7 \pm 0,17$ мг/г, для інших видів він становив: *L. alpinum* – $8,9 \pm 2,03$ мг/г, *L. sibirica* – $6,9 \pm 1,46$ мг/г, *G. glabra* – $1,5 \pm 0,65$ мг/г (табл. 2), що було найнижчим показником серед видів, що вивчалися.

Висновки

Культивування в умовах *in vitro* може викликати зміни у процесах синтезу біологічно активних сполук. Однак проведені нами дослідження не показали значних відмінностей у кількісному вмісті фруктозовмісних цукрів, загального розчинного білка, а також антиоксидантних властивостей екстрактів досліджуваних рослин *in vitro* порівняно з результатами інших учених щодо рослин цих видів, культивованих у відкритому ґрунті. Винятком були лише дані антиоксидантної активності *G. glabra*, яка, згідно з

Таблиця 2

Антиоксидантна активність, вміст загального розчинного білку та поліфруктанів в листкових екстрактах дослідних видів

Вид	Вміст загального розчинного білку, мг/г маси	АОА, %	Вміст поліфруктанів, мг/г маси
<i>Ligularia sibirica</i>	$6,6 \pm 0,59$	77,6	$6,9 \pm 1,46$
<i>Leontopodium alpinum</i>	$9,3 \pm 0,66$	65,1	$8,9 \pm 2,03$
<i>Crambe tataria</i>	$4,9 \pm 0,10$	100	$8,7 \pm 3,98$
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	$12,7 \pm 4,15$	73,1	$1,5 \pm 0,65$
<i>Iris sibirica</i>	$7,6 \pm 2,02$	88	$16,7 \pm 0,17$

нашими дослідженнями *in vitro*, виявилася дещо вищою за ту, що була описана в наукових літературних джерелах для цього виду за умови його культивування *in vivo*. Також було вперше оцінено вміст ПФ, білка та АОА для *C. tataria*. Отри-

мані результати свідчать про те, що такий вид потребує подальшого дослідження, зокрема вивчення біохімічного складу, оскільки потенційно може бути джерелом сполук із біологічною активністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин // Цитология и генетика. – 2010. – 44, № 3. – С. 58–72.
2. Анисимович И.П., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Фролов П.А., Мясникова П.А. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2010. – № 9 (80), Вып. 11. – С. 104–110.
3. Червона книга України. Рослинний світ / [відп. за ред. Я.П. Дідух]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Ерамков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143 с.
5. Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И.Е. Количественное определение содержания белка // Физиология растений. – 2011. – 58, № 4. – С. 624–230.
6. Okawa M., Kinjo J., Nohara T., Ono M. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medical plants // Biol. Pharm. Bull. – 2001. – 24, N 10. – P. 1202–1205.
7. Karami Z., Mirzaei H., Emam-Djomeh Z., Sadeghi Mahoonak A.R., Khomeiri M. Effect of harvest time on antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract and evaluation of its antibacterial activity International // Food Research J. – 2013. – 20, N 5. – P. 2951–2957.
8. Campbell B., Dug Yeo Han, Christopher M. Triggs, Alan G. Fraser, Lynnette R. Ferguson. Brassicaceae: nutrient analysis and investigation of tolerability in people with Crohn's disease in a New Zealand study // Functional Foods in Health and Disease. – 2012. – 2, N 11. – P. 460–486.
9. Sherif E.A. Badr, Dina M. Sakr, Sanaa A. Mahfouz and Mohamed S Abdelfattah. Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.): Chemical Composition and Biological Impacts // RJPBCS. – 4, Issue 3. – P. 606–621.
10. Razavi S.M., Zarrini G., Zahri S., Ghasemi K., Mohammadi S. Biological activity of *Crambe orientalis* L. growing in Iran // Phcog. Res. – 2009. – 1. – P. 125–129.
11. Syed Majid Bukhari, Nebojsa Simic, Hamid Latif S. Determination of Antioxidant Activity of *Crambe Cordifolia* // World Applied Sciences Journal. – 2013. – 22, N 11. – P. 1561–1565.
12. Шелифист А.С., Дзвінчук М.Д. Характеристика функціонування деяких компонентів антиоксидантної системи рослин в тканинах *Ligularia glauca* (L.) Hofm. і *L. Sibirica* (Cass.) за різних умов вирощування // Біологічні системи. – 2014. – 6, Вып. 2. – С. 108–112.
13. Shapna Sultana, Afroza Haque, Kaiser Hamid, Kaniz Fatima Urmi, Sumon Roy Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* // Agric. Biol. J. N. Am. – 2010. – 1, N 5. – P. 957–960.
14. Jun-Li Yang, Rui Wang, Yan-Ping Shi Phytochemicals and biological activities of *Ligularia* species // Nat. Prod. Bioprospect. – 2011. – 1. – P. 1–24.

PUSHKAROVA N.O., BELOKUROVA V.B., KUCHUK M.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: pushkarovan@mail.ua

SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ENDANGERED PLANT SPECIES CULTURED *IN VITRO*

Aim. Determination of total soluble protein content, polyfructan content and antioxidant activity in the extracts of five endangered plant species cultured *in vitro* in comparison with the same characteristics of *in vivo* grown plants according to the literature data. **Methods.** Fructan content in the extracts of fresh leaves was determined with Selivanov method. Antioxidant activity was measured with using DPPH method. Bradford method was used for total soluble protein determination. **Results.** Leaf extracts of *in vitro* grown plants of four studied species except *Glycyrrhiza glabra* showed high polyfructan content while high AOA and high protein content were determined for all studied species. There were no significant differences in the level of biological activity of *in vitro* plants and plants grown *in vivo* shown in other previous publications. **Conclusions.** The data on AOA, protein and polyfructan content confirmed a possibility of using *in vitro* grown plants of these species as a potential source of corresponding chemical compounds without disturbing their natural habitats. *Crambe tataria* was not ever studied for AOA, protein and polyfructan content, and our data show it is worth studying as a potential medical plant.

Keywords: endangered species, *in vitro* culture, antioxidant activity, protein content, polyfructan content.