

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ ԱՆՈՒՇ ՊԵՏՐՈՍԻ

***HYPERICUM PERFORATUM* L. ՄՇԱԿՈՒՄԸ
IN VITRO ԵՎ ՀԻԴՐՈՊՈՆԻԿ ՀԱՄԱԿՑՎԱԾ ՄԵԹՈԴՈՎ**

Գ.00.14 – «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

Երևան – 2013

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ВАРДАНЯН АНУШ ПЕТРОСОВНА

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *HYPERICUM PERFORATUM* L. СОПРЯЖЕННЫМ
МЕТОДОМ IN VITRO И ГИДРОПОНИКИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности **03.00.14** – «Биотехнология»

Ереван - 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝

կ.գ.դ. Է.Դ. Սարգսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ. Հ.Գ. Հովհաննիսյան

գ.գ.դ. Գ.Ժ. Սարգսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2013 թ. ապրիլի 5-ին ժամը 14⁰⁰ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՆ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ք. Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ./ֆաքս՝ (37410) 65 41 83:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2013 թ. մարտի 5-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.՝

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА

Научный руководитель:

д.б.н. Э.Д. Саркисян

Официальные оппоненты:

д.б.н. Г.Г. Оганесян

д.с-х.н. Г.Ж. Саркисян

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 5 апреля 2013 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА, действующего в НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс (37410) 654183

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 5 марта 2013 г.

Ученый секретарь

специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В последнее время тенденция развития лекарственной терапии характеризуется значительным использованием в медицине фитопрепаратов и лекарственных растений, способных воздействовать на физиологические процессы и повысить естественную защиту организма человека. Одно из ценных лекарственных растений Армянской флоры – зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), широко используется в традиционной и нетрадиционной медицине. Большой интерес *H. perforatum* в медицине обусловлен биологически активными веществами (БАВ) (гиперицин, псевдогиперицин, гиперфорин, флавоноиды, антоцианидины, дубильные, экстрактивные вещества и другие), определяющие его антивирусные, антиретровирусные, антиоксидантные, противовоспалительные, спазмолитические, антидепрессивные и др. свойства (Avato, 2005; Zheleva-Dimitrova, 2010). Из используемых в медицине лекарственных растений лишь 20–30% возделывается в культуре, потребность же остальных обеспечивается за счёт истощающейся из года в год дикорастущей флоры. *H. perforatum* не является редким видом, но систематические сборы для заготовки лекарственного сырья постепенно приводят к сокращению естественных природных запасов этого растения, поэтому целесообразнее вводить его в культуру. С этой целью разработка методов выращивания *H. perforatum* в управляемых условиях культуры *in vitro* и гидропонике для получения качественного посадочного материала и лекарственного сырья является актуальной проблемой. Во всем мире для выращивания различных растений успешно применяются как метод гидропонике, так и методы культуры *in vitro*, однако сопряжённое применение этих способов предоставит возможность решить ряд задач, связанных с качеством посадочного материала и получаемого растительного сырья. Метод клонального микроразмножения растений является одним из нетрадиционных способов охраны растений, позволяет масс-клонально размножать растения, создавать банки тканей *in vitro* и хранить сотни тысяч образцов растений на небольших площадях (Попов с соавт., 2000; Srivastava *et al.*, 2004; Holobiuc *et al.*, 2009). С внедрением технологии гидропонического производства растений возможно создание культивируемых плантаций ценных видов растений и получение высокого урожая качественного, экологически чистого растительного сырья (Давтян, 1982; Майрапетян, 1989; Economakis, 2008). Гидропоника также является дополнительным способом охраны растительных ресурсов.

Поэтому разработка и совершенствование биотехнологии культивирования *H. perforatum* сопряжённым методом культуры *in vitro* и гидропонике предоставит возможность выращивать однородный посадочный материал, повысить продуктивность растений и получить качественное растительное сырьё с высоким содержанием БАВ, что имеет большое народнохозяйственное, экологическое значение и является актуальной задачей.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка научнообоснованной биотехнологии ускоренного размножения посадочного материала в условиях *in vitro*, создание гидропонической культуры *H. perforatum* и получение качественного лекарственного сырья с применением методов культуры *in vitro* и открытой гидропонике. Для реализации цели поставлены следующие задачи:

- установить оптимальные условия стерилизации при введении *H. perforatum* в культуру *in vitro*;
- разработать условия культивирования *in vitro*, подобрать оптимальные питательные среды и регуляторы роста для получения первичного каллуса из различных эксплантов, индукции процессов морфогенеза, ризогенеза и клонального микроразмножения;

- провести акклиматизацию микрорастений для дальнейшего выращивания их в условиях открытой гидропоники и почвы;
- изучить особенности роста, развития микрорастений в беспочвенных и почвенных условиях;
- изучить влияние условий культивирования, гидропонических наполнителей и возраста растений на урожайность и качество лекарственного сырья;
- провести фитохимическое исследование гидропонического и почвенного растительного сырья;
- определить антирадикальную активность (АРА) экстрактов из лекарственного сырья *H. perforatum*;
- определить содержание радионуклидов (РН) и тяжелых металлов (ТМ) в гидропоническом и почвенном лекарственном сырье;
- оценить экономическую эффективность сопряженного метода *in vitro* и гидропоники.

Научная новизна работы. Впервые применен сопряженный метод культуры *in vitro* и открытой гидропоники для ускоренного размножения однородного посадочного материала и получения лекарственного сырья *H. perforatum*:

- в культуре *in vitro* методом клонального микроразмножения получен качественный посадочный материал;
- изучены особенности роста и развития микрорастений *H. perforatum* в условиях открытой гидропоники и почвы;
- создана гидропоническая культура *H. perforatum*;
- в гидропонических условиях проведено вегетативное размножение *H. perforatum* делением кустов;
- выявлено влияние возраста растений на продуктивность лекарственного сырья;
- изучено влияние гидропонических наполнителей на продуктивность и качество лекарственного сырья;
- установлены качественные различия лекарственного сырья *H. perforatum*, культивированного в условиях открытой гидропоники, почвы и дикорастущего на содержание БАВ и ТМ;
- проведены радиохимические исследования гидропонических и почвенных растений;
- определена АРА экстрактов гидропонического и почвенного лекарственного сырья;
- рассчитана экономическая эффективность предлагаемого сопряженного метода культуры *in vitro* и гидропоники;
- показана эффективность применяемого метода для ускоренного размножения, повышения продуктивности и качества культивируемых растений.

Теоретическая и практическая значимость работы. Благодаря разработанной биотехнологии, из полученного в культуре *in vitro* посадочного материала можно создать гидропоническую культуру *H. perforatum* и получить высокий урожай качественного, экологически чистого лекарственного сырья с высоким содержанием БАВ и низким содержанием РН и ТМ, которое может заменить сырье из дикорастущих растений. Основные результаты работы могут послужить руководством для широкого внедрения сопряженного метода культуры *in vitro* и гидропоники в производство посадочного материала для получения лекарственного сырья как *H. perforatum*, так и других ценных видов растений, с организацией культивируемых промышленных гидропонических плантаций.

На защиту выносятся:

- результаты исследований по получению изолированных культур *H. perforatum*, оптимизации условий выращивания, клонального микроразмножения и получения посадочного материала;

- результаты сравнительного изучения роста, развития, продуктивности микрорастений в гидропонических и почвенных условиях;
- результаты сравнительного изучения качества гидропонического, почвенного и дикорастущего лекарственного сырья на содержание БАВ и ТМ;
- результаты определения АРА экстрактов гидропонического и почвенного лекарственного сырья;
- результаты исследования гидропонического и почвенного лекарственного сырья на содержание РН;
- результаты расчётов экономической эффективности выращивания *H. perforatum* сопряженным методом культуры *in vitro* и гидропоники.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на заседаниях учёного совета Института проблем гидропоники (ИПГ) им. Г.С.Давтяна НАН РА (Ереван, 2001–2011); международной научной конференции, посвящённой 75-летию основания Государственного аграрного университета Армении (Ереван, 2005); XIV международном симпозиуме “Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье” (Украина, Симферополь, 2005); международной конференции “Успехи биотехнологии: перспективы развития в Армении” посвящённой 35-летию НИИ биотехнологии (Цахкадзор, 2006); международной конференции “Важность экологии и охраны природы в перспективах устойчивого развития”- ЕГУ (Ереван, 2008); международной конференции “Современные проблемы беспочвенной культуры растений”, посвящённой 100-летию со дня рождения Г.С.Давтяна (Ереван, 2009); международной научной конференции, посвящённой 80-летию основания Государственного аграрного университета Армении (Ереван, 2010); международной конференции, посвящённой 90-летию создания Ереванского государственного медицинского университета (Ереван, 2010); 39-ом заседании Европейского общества радиационного исследования (Италия, Виетри-суль-Маре, 2012).

Место выполнения работы. Исследования проводились в течение 2001–2011 гг. в лаборатории “Культуры ткани” и экспериментальной гидропонической станции ИПГ им. Г.С.Давтяна НАН РА.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания объекта и методов исследования, изложения полученных экспериментальных данных и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, содержит 18 таблиц, 34 рисунка. Список цитируемой литературы включает 247 наименования армянских, русских и иностранных источников.

Публикации. Основные результаты исследования опубликованы в 12-ти научных работах.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования служил *H. perforatum* L.. При введении в изолированную культуру эксплантами служили растения, полученные из стерильно пророщенных семян, предварительно простерилизованных в 0.1% раствором диоксида или 10% перекисью водорода. Для инициации каллусогенеза использовались сегменты листа, стебля, корня (0.5 см) и апикальные почки (0.1 см) микрорастений.

Посадочным материалом в условиях открытой гидропоники и почвы служили микрорастения, выращенные в культуре *in vitro*.

Материалом для фитохимических и радиохимических исследований служило воздушносухое лекарственное сырьё *H. perforatum*, полученное в условиях открытой гидропоники, почвы и дикорастущее, собранное в окрестностях Гарни и Севана.

Методика и схемы опытов. В работе использованы общепринятые методы работы с изолированными тканями растений (Бутенко, 1964; Калинин с соавт., 1980).

Питательные среды – приготовлены по прописи Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962).

Для получения первичных каллусных тканей и индукции морфогенеза были использованы модифицированные нами питательные среды, с минеральной основой МС (N1–N10), содержащие 1.0 мг/л тиамина, 0.5 мг/л пиридоксина, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара, БАП (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 5.0; 6.0 мг/л) и ИУК (0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 5.0; 6.0 мг/л), где возрастающая концентрация одного из гормонов роста соответствовала убывающей концентрации другого.

Для укоренения микрочеренков и побегов-регенерантов использовались модифицированные питательные среды на основе среды МС с половинной концентрацией микро- и макроэлементов, содержащие 10 г/л сахарозы, 1.0 мг/л тиамина, 0.5 мг/л пиридоксина и 0.1 мг/л ИМК, 7 г/л агара (N II), и жидкая питательная среда сходного состава (N III). В качестве контроля использовалась безгормональная среда (N I).

Акклиматизация пробирочных растений проводилась в течение 4.5 недель, затем микрорастения пересаживались в вегетационные деланки открытой гидропоники и почвы (контроль) по 5 шт. на 1 м².

В открытых гидропониках исследованы гидропонические наполнители гравий и вулканический шлак, с диаметром частиц 3–15 мм и питательный раствор, разработанный Г.С.Давтяном (Давтян, 1980).

Фитохимические и радиохимические анализы растительного сырья.
Определение: гигроскопической влажности, общей золы, экстрактивных веществ (извлекаемых 40% этиловым спиртом) и дубильных веществ проведены по методике (Химический анализ..., 1983; ГФ СССР, 1990);

суммы флавоноидов проведено методом дифференциальной спектроскопии в 70% этанольном экстракте, в пересчёте на рутин, при длине волны 412 нм (ГФ СССР, 1990; Правдивцева, Куркин, 2008);

суммы антраценпроизводных проведено методом прямой спектроскопии, в 70% этанольном экстракте, в пересчёте на гиперин, при длине волны 591 нм (Правдивцева, Куркин, 2008), рутина – в 50% этанольном экстракте, при длине волны 375 нм (Георгиевский с соавт., 1990);

гиперина, псевдогиперина и гиперфорина проведено методом ВЭЖХ (Nuevas-Paz *et al.*, 2005) в аналитической лаборатории “Экслаб” Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий ЗАО, Л. Меликяном по трудовому соглашению;

антирадикальной активности проведено фотометрическим методом, основанном на взаимодействии антиоксидантов со стабильным хромоген-радикалом ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (C₁₈H₁₂N₅O₆)) в лаборатории «Природных соединений» Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии НАН РА (Мнацаканян с соавт., 2009; Кочикян с соавт., 2009); для анализа использованы: ДФПГ (Sigma Aldrich GmbH); сухие спиртовые растительные экстракты, приготовленные экстракцией воздушносухого растительного сырья в 70% этаноле;

радионуклидов: ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs проведено радиохимическим методом (Павлоцкая, 1966), а U–экстракционным фотометрическим методом (Пристер, Зубач, 1968). Полученные результаты искусственных РН сравнивались с государственными стандартами предельно допустимых концентраций (ПДК) РФ (Нормы..., 1999); анализы проведены сотрудниками агрохимической и радиохимической лаборатории ИПГ им. Г.С.Давтяна НАН РА, под руководством к.с.-х.н. Л.М.Калачяна;

тяжелых металлов (Mn, Zn, Cu, Ti, Cr, Ni, Mo, Pb, Ag, Sn, V, Co) проведено количественным спектральным методом (Кустанович, 1972) в спектральной лаборатории Института геологии НАН РА, к.тех.н. К.А.Погосяном, по трудовому соглашению. ПДК ТМ представлены в соответствии со стандартными требованиями ВОЗ и МЗ РФ (Медицинская экология..., 2003; Dueck *et al.*, 1984; WHO, 2005).

Статистическая обработка результатов проведена по Б.А.Доспехову (Доспехов, 1985) и с помощью пакета стандартных статистических программ Graph Pad Prism5 и Excel, с подсчётом стандартного отклонения \pm (CO) и средней ошибки (M \pm m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Культивирование *Hypericum perforatum* в культуре *in vitro* и гидропонике.

Введение в культуру ценных дикорастущих лекарственных растений и создание их промышленных плантаций с получением экологически чистого, качественного лекарственного сырья новейшими методами сельскохозяйственной биотехнологии – гидропонике и клонального микроразмножения является актуальной научно-практической проблемой, что имеет также важное экологическое значение.

Клональное микроразмножение *H. perforatum* в культуре *in vitro*. Метод клонального микроразмножения – один из наиболее эффективных способов получения посадочного материала ценных культур, генетически идентичных материнским растениям, обеспечивающий высокий коэффициент размножения (Высоцкий, 1986).

С целью ускоренного размножения *H. perforatum* в культуре *in vitro* исследования проведены по следующим направлениям:

- получение свободных от инфекций семян и проростков;
- индукция каллусогенеза с последующей дифференциацией адвентивных почек и впоследствии регенерацией побегов из первичной каллусной ткани с использованием питательных сред с различными модификациями;
- клональное микроразмножение (микрочеренкование) на питательной среде МС, с половинной концентрацией макро- и микросолей, содержащая ИМК.

При получении свободных от инфекций семян оптимальным оказался 0.1% диацид, с эффективностью стерилизации 99%, а при использовании 10% перекиси водорода процент незаражённых семян составил 20%. Семена в *in vitro* условиях начали прорасти через 8 дней после посева; при режиме культивирования: температура камеры искусственного климата 17 – 23 °С, 70% влажности и 16-ти часовом фотопериоде, можно получить 99% прорастаемости семян.

Индукция каллусогенеза и морфогенеза *H. perforatum*. В наших исследованиях эксплантами для получения каллусных тканей служили сегменты листьев, стеблей, почек и корней микрорастений *H. perforatum*, полученных из стерильно пророщенных семян. Экспланты раневыми поверхностями высаживались на питательные среды для каллусообразования, с различным сочетанием БАП (0.5 – 6.0 мг/л) и ИУК (6.0 – 0.5 мг/л) (табл. 1). Все изученные нами экспланты из вегетативных органов микрорастений имели тенденции к каллусообразованию и обладали органогенной способностью регенерировать множественные побеги. Первые признаки пролиферации у эксплантов листовой пластинки, сегментов стебля и почек наблюдали на 7-ые – 8-ые сутки культивирования, а у корневого экспланта на 10-ые – 12-ые сутки. Образовавшиеся каллусы были средней плотности, желтовато-зеленого цвета. На образовавшемся первичном каллусе уже на 10-ый день культивирования наблюдали спонтанное закладывание многочисленных стеблевых почек: у почечного экспланта – на питательных средах N1–N5, экспланта стебля – на питательных средах N4 и N5 и экспланта листа – на питательной среде N5. Морфогенная активность

первичного каллуса листового происхождения на питательных средах N1 – N4 и экспланта стебля – на средах N1 – N3 наблюдалась на 20-ый день инкубации. У корневого каллуса закладывание стеблевых почек наблюдалось на 20-ый – 30-ый день со дня посадки.

Таблица 1

Влияние регуляторов роста на регенерационную способность эксплантов *H. perforatum* в изолированной культуре

Варианты	Регуляторы роста, мг/л		Экспланты							
	ИУК	БАП	лист		стебель		почка		корень	
			каллус	кол-во побегов, штук	каллус	кол-во побегов, штук	каллус	кол-во побегов, штук	каллус	кол-во побегов, штук
N 1	6.0	0.5	+	22±2.16	+	12±1.58	+	14±1.63	+	5±0.81
N 2	5.0	1.0	+	26±1.41	+	10±1.41	+	18±1.41	+	10±1.63
N 3	4.0	1.5	+	27±1.41	+	18±1.63	+	13±1.41	+	5±0.81
N 4	3.5	2.0	+	30±1.82	+	26±1.41	+	18±1.82	+	20±1.63
N 5	3.0	2.5	+	30±2.58	+	25±1.82	+	23±2.16	+	5±0.81
N 6	2.5	3.0	+	-	+	-	+	-	+	-
N 7	2.0	3.5	+	10±1.54	+	-	+	-	+	-
N 8	1.5	4.0	+	-	+	-	+	-	+	-
N 9	1.0	5.0	+	15±1.81	+	-	+	-	+	-
N10	0.5	6.0	+	-	+	-	+	-	+	-

Результатами исследования выявлено, что в питательной среде, сочетание высокой концентрации ауксина (от 3.0 до 6.0 мг/л) и низкой – цитокинина (от 0.5 до 2.5 мг/л), стимулировало морфогенез на первичном каллусе с образованием множественных побегов (рис. 1).



Рис. 1. Адвентивные побеги, регенерированные на первичном каллусе:

1 - эксплант стебель, 2 - эксплант лист, 3 - эксплант почка

Уменьшение в питательной среде ауксина (2.5 – 0.5 мг/л) и увеличение цитокинина (3.0 – 6.0 мг/л) стимулировало только успешное образование каллусной ткани, но в случае экспланта листового происхождения, на питательных средах N7 и N9, наблюдали морфогенез, хотя образовавшиеся побеги-регенеранты морфологически отличались от исходных растений, что можно объяснить повышенным содержанием цитокинина в среде. Наилучшая морфогенная активность первичных каллусов из листового экспланта наблюдалась на средах N2, N3, N4 и N5, стеблевого экспланта - на средах N3, N4 и N5, экспланта почки - на средах N2, N4 и N5, а корневого экспланта - на среде N4. Полученные побеги-регенеранты в дальнейшем размножались микроочеркованием с перенесением их на свежую питательную среду для корнеобразования.

Таким образом, все испытанные нами экспланты из вегетативных органов микрорастений *H. perforatum* образуют первичный каллус. Высокой органогенной активностью выделялся листовая эксплант, а низкой – корневой. Для инициации адвентивных побегов из первичного каллуса оптимальными оказались питательные среды N1, N2, N3, N4 и N5.

Индукция ризогенеза у микрочеренков в культуре *in vitro*. С целью получения однородного посадочного материала предпочтение отдано методу клонального микроразмножения. Материалом для начальной стадии микроразмножения служили апикальные сегменты проростков высотой 0.5 – 0.6 см с одной парой листочков. Для укоренения эксплантов использовались питательные среды N II и N III на основе среды МС, с половинной концентрацией микро- и макроэлементов, содержащие ИМК. Клональное микроразмножение проводилось микрочеренкованием, с интервалом в 1 месяц.

Микрочеренки с апексом или без апекса (1.2 – 1.5 см) с одним узлом помещались вертикально на свежую питательную среду для корнеобразования. Исследования показали, что микрорастения с апексом по высоте в 1.3 раза превышали микрорастения без апекса, но в случае микрочеренков без апекса, через 30 дней наблюдали образование в среднем до 5 придаточных побегов в одной пробирке. Результаты исследования выяснилось, что микрочеренки с верхних ярусов (I, II, III) имели высокую приживаемость (90%) по сравнению с нижними - (IV, V, VI) (50%). Корнеобразование у микрочеренков с апексом составило 98%, а без апекса – 80%. Коэффициент размножения с одного микрорастения составил 9 за один пассаж. Испытанная нами жидкая питательная среда N III оказалась неэффективной, так как микрочеренки погибали, по всей вероятности, из-за высокой влажности.

Побеги-регенеранты, образованные на первичном каллусе, с целью укоренения пересаживались на свежие питательные среды N I и N II. Через 6 – 7 дней после пересадки на микропобегах на среде N II образовались зачатки корней, а на безгормональной питательной среде N I корнеобразования не наблюдалось. Выяснилось, что наибольшей ризогенной активностью обладают микрорастения, регенерированные из первичного каллуса корневого (73%) и почечного происхождения (60%), а наименьшей (30%) – листового. Через 20 – 25 дней после посадки у каждого микропобега образовалось в среднем от 5 – 7 штук придаточных побегов.

В процессе микроразмножения растений-регенерантов, инициированных из каллусных тканей, наблюдались растения с нестандартными для данного вида строением и расположением листьев. Поэтому для дальнейшего размножения посадочного материала целесообразно в качестве основного материала использовать микрорастения, размноженные микроклонально из микрочеренков, отличающихся от остальных вариантов стандартным габитусом и высокой жизнеспособностью.

Установлена возможность круглогодичного микроразмножения растений *H. perforatum* и получения посадочного материала в культуре *in vitro*.

Акклиматизация микрорастений. Процесс акклиматизации микрорастений нами проведен еще в камере искусственного климата, где для поддержания высокого уровня фотосинтеза в течение недели повышали интенсивность освещения, увеличивали разницу между температурой светового (20 – 21°C) и темнового (12 – 15°C) периодов. За неделю перед пересадкой микрорастений в субстрат ватные пробки с пробирок снимались. Четырёхмесячные микрорастения высотой 7.0 – 8.5 см с развитой корневой системой пересаживались в вазоны с перлитом. Для сохранения влажности первые пять дней адаптации микрорастения закрывали стеклянными стаканами, затем их снимали, и таким образом, постепенно снижая влажность, доводили ее до параметров открытого грунта. Коэффициент выживаемости адаптированных микрорастений составил 90 %. В конце

апреля рассада пересаживалась в открытую гидропонику, где субстратом вегетационных делянок служили наполнители вулканический шлак и гравий, а контролем – почва. В открытой гидропонике высокая приживаемость акклиматизированных саженцев наблюдалась на вулканическом шлаке – 78 % и в контрольном варианте – 70 %, а низкая – 50 % на гравии. Параллельно с пересадкой акклиматизированных микрорастений, при благоприятных климатических условиях (пасмурная погода, температура воздуха 15–18°C), в гидропонике проводили пересадку микрорастений без предварительной акклиматизации (в вазонах с перлитом), на те же субстраты. Положительный результат получен на вулканическом шлаке, с 75 % приживаемостью. В остальных вариантах микрорастения не прижились. Таким образом, благоприятный микроклимат гидропоники и пористая структура вулканического шлака, где поддерживается необходимая влажность для корневой системы, дают возможность сократить адаптационный период.

Культивирование *H. perforatum* в условиях открытой гидропоники и почвы.

Армения – одна из немногих стран, где используется технология открытой гидропоники, которая с экономической точки зрения более эффективна, чем тепличная гидропоника. Это связано с благоприятными климатическими условиями Араратской долины, где продолжительность вегетационного периода составляет 7–8 месяцев. Согласно биометрическим и фенологическим наблюдениям на первом году культивирования гидропонические растения выделялись высокими показателями роста и развития. Растения на наполнителе гравий по высоте и побегообразованию превышали почвенные растения в 1.2 и 1.6 раза соответственно, а на наполнителе вулканический шлак, по количеству побегов в 1.5 раза превышали контрольные. В гидропонической системе периодическая подача и слив питательного раствора позволяют бесперебойно снабжать корневую систему растений кислородом, что приводит к усиленному обмену веществ в клетках корней и, в свою очередь, интенсифицирует метаболические и формообразовательные процессы во всем растении. Таким образом, при беспочвенном культивировании, по сравнению с традиционным, развитие растений ускоряется. По литературным данным, *H. perforatum* в основном цветет и плодоносит на втором году культивирования, в первом году зацветают только единичные растения (Pluhar *et al.*, 2002). Нашими исследованиями выявлено, что на первом году культивирования микрорастения *H. perforatum*, после пересадки из *in vitro* условий в открытую гидропонику, через 3.5 месяца цвели (50 % растений) с конца июля по август только на наполнителе гравий. Растения, выращенные на наполнителе вулканический шлак и в контрольном варианте на первом году не цвели.



Рис.2. *H. perforatum* в фазе цветения в условиях открытой гидропоники и почвы:
а- гидропонические растения; б- почвенные растения

Начиная со второго года культивирования, растения цвели и плодоносили как в условиях открытой гидропоники, так и почвы, и были пригодны для сбора растительного сырья. Гидропонические и почвенные растения отличались по срокам прохождения фенофаз. Бутонизация и цветение гидропонических растений наблюдалось на 10–15 дней раньше почвенных. В период бутонизации гидропонические растения, выращенные на наполнителе гравий, по высоте побегов в 1.5 раза, а на наполнителе вулканический шлак – в 1.4 раза превышали контрольные. Гидропонические растения отличались от почвенных большей ветвистостью стеблей и обилием соцветий (рис. 2).

В условиях гидропоники с первой декады июня можно проводить первый укос, а со второй декады июля – второй. В почвенных условиях урожай собирали на 10 дней позже, со второй декады июня – первый укос, и с третьей декады июля – второй. В фазе цветения гидропонические растения достигали в среднем 59.1 – 69.1 см высоты, превышая почвенный контроль в 1.3 и 1.5 раза.

Таким образом, в первый год культивирования гидропонические растения выделялись высокими показателями роста и развития, и на наполнителе гравии наблюдалось цветение некоторых растений. В условиях открытой гидропоники со второго года выращивания бутонизация и цветение растений наступало раньше, по сравнению с почвенными.

Урожай лекарственного сырья в условиях открытой гидропоники и почвы.

Лекарственным сырьем *H. perforatum* служит надземная часть (15 – 30 см) растения, собранная в фазе цветения. В медицине используется высушенная трава - Herba Hyperici, представляющая собой облиственные верхушки стеблей с листьями, цветками, бутонами и недозрелыми плодами (ВОЗ, 2010). Нашими исследованиями выявлено, что сбор сырья с длиной стебля до 20 см, а не 30 см, позволил растениям в тот же вегетационный период быстро развивать новые цветущие побеги, что, в свою очередь, способствовало получению второго урожая в течение одного вегетационного периода. Результаты представленные на рис. 4 показывают, что при гидропоническом (наполнитель гравий) культивировании урожай воздушносухого лекарственного сырья с трехлетних растений в 2.3 раза при первом укосе больше, по сравнению со вторым. По урожайности растения на наполнителе вулканический шлак и в почве, как при первом, так и втором укосах, существенно не отличались. Данные, представленные на рис. 3 и в таблице 2, показывают, что вид гидропонического наполнителя влияет на продуктивность растений.

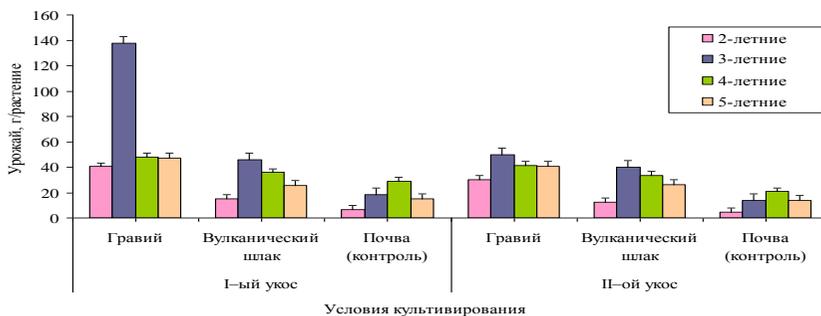


Рис.3. Урожай *H. perforatum* в условиях открытой гидропоники и почвы при первом и втором укосах

Наиболее высокий урожай лекарственного сырья получен на наполнителе гравий, который у двулетних, трехлетних, четырехлетних и пятилетних растений, по сравнению с почвенным контролем, в 6.2; 5.8; 1.8 и 3.0 раза, а по сравнению с наполнителем

вулканический шлак в 2.6; 2.2; 1.3 и 1.7 раза больше соответственно. По сравнению с контролем, урожай, полученный на наполнителе вулканический шлак, в 2.4; 2.6; 1.4 и 1.8 раза больше у двулетних, трехлетних, четырехлетних и пятилетних растений соответственно.

Таблица 2

Урожай *H. perforatum* в условиях открытой гидропоники и почвы

Наполнитель	Возраст растений	Высота растений, см	Количество укосов	Урожай				
				сырой		воздушносухой		%
				г/раст.	г/м ²	г/раст.	г/м ²	
Гравий	1-летние*	30.3	1	23.8	119.0	6.0	30.0	25.2
	2-летние	64.0	2	235.5	1177.5	30.1	354.5	30.1
	3-летние	80.2	2	555.5	2777.5	33.8	940.0	33.8
	4-летние	67.0	2	348.6	1743.0	89.5	447.5	25.7
	5-летние	65.0	2	321.0	1605.0	87.8	439.0	27.4
	НСР ₀₅	---	---	---	---	---	85.0	---
Вулканический шлак	1-летние	14.1	---	---	---	---	---	---
	2-летние	62.0	2	90.2	451.0	27.8	139.0	30.8
	3-летние	58.0	2	289.5	1447.5	86.0	430.0	29.7
	4-летние	56.2	2	261.5	1307.5	69.5	347.5	26.6
	5-летние	60.0	2	185.5	927.5	51.6	258.0	27.8
	НСР ₀₅	---	---	---	---	---	70.0	--
Почва (контроль)	1-летние	12.5	---	---	---	---	---	---
	2-летние	47.6	2	34.3	171.7	11.5	57.5	33.5
	3-летние	50.0	2	128.6	643.0	32.4	162.0	25.2
	4-летние	45.0	2	132.5	662.5	50.0	250.0	37.7
	5-летние	44.0	2	105.9	529.5	29.0	145.0	27.4
	НСР ₀₅	---	---	---	---	---	55.0	---

*При расчёте НСР₀₅ однолетние растения не учтены

Исследованиями выявлено, что на продуктивность влияет не только способ выращивания, но и возраст растений. Согласно литературным данным, при традиционном возделывании и хорошем уходе, средний урожай воздушносухого лекарственного сырья *H. perforatum* составляет 150 – 250 г/м² с двухлетних, и до 300 – 400 г/м² с трехлетних растений (Buter *et al.*, 1998). В наших экспериментах, в гидропонических условиях на наполнителе гравия урожай воздушносухого сырья с двухлетних растений составил 354.6 г/м², а с трехлетних растений – 940 г/м², что превышало почвенный контроль в 6.2 и 5.8 раза соответственно (табл. 2). Результаты экспериментов показали, что в гидропонике максимальный урожай получен с трехлетних, а минимальный – с двухлетних растений, затем наблюдали постепенное снижение урожайности. На наполнителе гравия четырехлетние и пятилетние растения по продуктивности существенно не отличались друг от друга. В случае почвенного контроля максимальный урожай получен на четвертом году культивирования растений. Гидропоническую плантацию *H. perforatum* можно возделывать до пяти лет, поэтому ее периодически нужно обновлять молодыми саженцами. В гидропонических условиях эту культуру можно размножать и делением кустов, где коэффициент размножения с одного гидропонического растения составил 6, с 95% приживаемости.

Таким образом, на основании полученных результатов исследований можно прийти к выводу, что на продуктивность *H. perforatum* влияют качество посадочного материала, условия культивирования, вид гидропонического наполнителя, возраст растений. В

условиях Араратской долины сбор урожая травы зверобоя возможно проводить в два укоса. В гидропонических условиях возможность получения высокого урожая увеличивается, по сравнению с традиционным методом культивирования. Оптимальный гидропонический наполнитель – гравий, где урожай воздушносухого сырья в зависимости от возраста растений в 1.8 – 6.2 раза выше по сравнению с почвенным контролем. В условиях открытой гидропоники максимальный выход урожая получается с трёхлетних растений.

2. Влияние условий культивирования на качество лекарственного сырья *Hypericum perforatum*. На международном рынке спрос на лечебные препараты растительного происхождения постоянно растёт, вместе с ним растёт и потребность на лекарственное растительное сырье, следовательно возрастают и требования к его качеству (ГФ, 1990; ВОЗ, 2010). Поэтому изучение качества полученного лекарственного сырья *H. perforatum* является важной частью данной работы.

Фитохимическое исследование лекарственного сырья. ВЭЖХ анализ экстрактов лекарственного сырья *H. perforatum*, выращенного в условиях гидропоники (наполнители – гравий, вулканический шлак) и почвы, выявил наличие основных действующих веществ – гиперидина, псевдогиперидина и гиперфорина (табл. 3, рис. 4, 5).

Таблица.3

Содержание гиперидина, псевдогиперидина и гиперфорина в лекарственном сырье трёхлетних растений в зависимости от условий выращивания, мг/г

Наполнитель	Гиперидин	Псевдогиперидин	Гиперфорин	Сумма
Гравий	0.16	0.08	12.23	12.47
Вулканический шлак	0.54	0.40	6.95	7.89
Почва (контроль)	0.80	0.09	4.55	5.44

Результаты исследования, представленные в таблице 3, показывают, что экстракты гидропонических растений по суммарному количеству гиперидина, псевдогиперидина и гиперфорина превышают контроль: на гравии в 2.3, а на вулканическом шлаке в 1.4 раза. Сравнивая результаты всех вариантов можно отметить, что высокие показатели суммы гиперидина, псевдогиперидина и гиперфорина в лекарственном сырье, полученном на наполнителе гравий, обусловлены высоким содержанием в них гиперфорина – 12.23 мг/г, что в 1.8 раза превышает его количество на вулканическом шлаке, и 2.7 раза в почвенном контроле. В гидропонических растениях высокое содержание гиперфорина связано с обилием соцветий, поскольку гиперфорин, в основном, локализуется в бутонах и цветках.

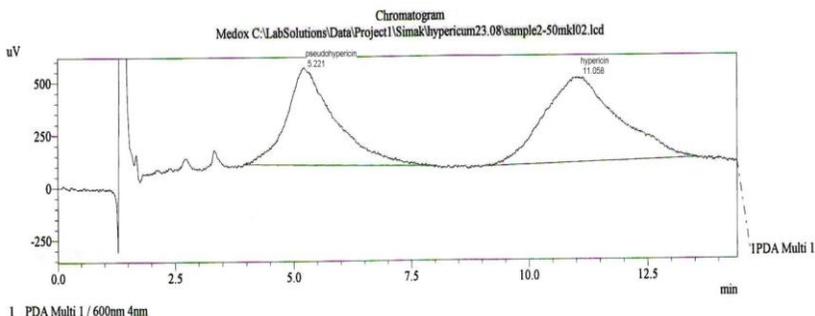


Рис.4. Содержание гиперидина и псевдогиперидина в экстракте трёхлетних растений *H. perforatum*, выращенных на наполнителе вулканический шлак

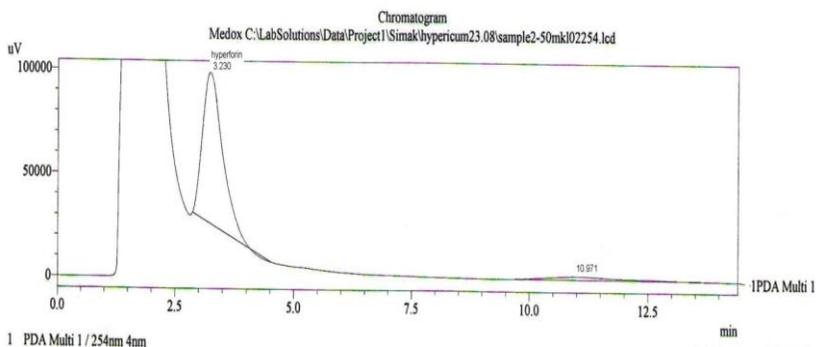


Рис.5. Содержание гиперфорина в экстракте трёхлетних растений *H. perforatum*, выращенных на наполнителе вулканический шлак

Сравнительно высокие показатели псевдогиперицина обнаружены в растениях, выращенных на наполнителе вулканический шлак, что превышает показания на гравии в 5.0 и контроль в 4.4 раза. Высоким содержанием гиперидина отличались растения почвенного контроля, превышающие растения на вулканическом шлаке в 1.5 и гравии в 5 раз. Содержание гиперидина в растениях, выращенных на наполнителе вулканический шлак, в 3.4 раза было выше, чем у растений на гравии.

Установлено также, что возраст растений и условия выращивания оказывают определенное влияние на образование БАВ в растениях. Сравнительно высоким содержанием экстрактивных, дубильных веществ и суммы флавоноидов отличались двухлетние и четырехлетние растения обоих гидропонических вариантов. По содержанию суммы флавоноидов наилучшими вариантами оказались четырехлетние растения как гидропонники, так и почвенного контроля (табл. 4).

Таблица 4

Содержание суммы флавоноидов в зависимости от условий культивирования и возраста растений, %

Условия культивирования и произрастания		Возраст растений			
		2-летние	3-летние	4-летние	5-летние
Гидропоника	гравий	3.6±0.2	3.0±0.3	3.8±0.5	3.4±0.6
	вулканический шлак	3.8±0.6	3.4±0.4	4.3±0.5	3.7±0.4
Почва	Ереван (контроль)	2.6±0.5	2.4±0.5	3.3±0.2	2.8±0.5
	Севан (дикорастущее)	3.8±0.2			
	Гарни (дикорастущее)	3.5±0.4			
	По ГФ (1990)	не менее 1.5%			

Сравнивая результаты анализов суммы флавоноидов дикорастущего и культивированного сырья выяснилось, что четырехлетние растения на вулканическом шлаке превышали гравийные, контрольные и дикорастущие растения Севана и Гарни в 1.1, 1.3, 1.1 и 1.2 раза соответственно. Сравнительно низкие результаты флавоноидов получены у трехлетних растений всех вариантов, и, по всей вероятности, можно предположить, что

это обусловлено высоким урожаем. Контрольные растения по содержанию суммы флавоноидов значительно уступали гидропоническим и дикорастущим. Исследованиями выявлено, что высоким содержанием флавоноидов отличалось лекарственное сырье на вулканическом шлаке первого урожая, что в 1.2 раза выше показателей второго урожая (рис. 6). Содержание флавоноидов в растительном сырье, выращенном на наполнителе гравий, как при первом, так и втором урожаях одинаковое.

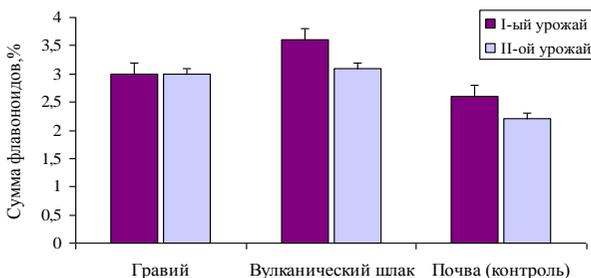


Рис.6. Содержание суммы флавоноидов в лекарственном сырье трехлетних растений *H. perforatum*, в условиях открытой гидропоники и почвы

Результаты, представленные на рис. 7, показывают, что растения, выращенные на вулканическом шлаке (первый урожай), по содержанию суммы антраценпроизводных в 1.5 раза превышают растения гравия и в 2.5 раза – почвенный контроль. При втором урожае высокими показателями отличались растения, выращенные на гравии и почве, которые в 1.6 и 1.2 раза, соответственно, превышали первый урожай. Лекарственное сырье обоих гидропонических вариантов (вулканический шлак и гравий) по содержанию антраценпроизводных в 1.6 и 1.3 раза соответственно превышало почвенный контроль. Следовательно, содержание суммы антраценпроизводных в гидропоническом лекарственном сырье выше почвенного контроля.

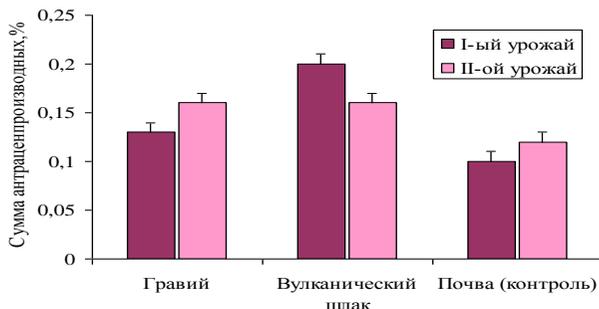


Рис. 7. Содержание суммы антраценпроизводных в лекарственном сырье трехлетних растений *H. perforatum*, в условиях открытой гидропоники и почвы

По содержанию рутина сравнительно высокими показателями отличались гидропонические растения, выращенные на наполнителе вулканический шлак (2.6%), которые в 1.4 раза превышали почвенный контроль и в 1.3 раза – гравийные растения.

Содержание дубильных и экстрактивных веществ во всех исследованных вариантах лекарственного сырья высокое. Наибольшее количество дубильных веществ обнаружено в дикорастущем сырье из окрестностей Севана и в четырехлетних растениях почвенного

контроля. Высоким содержанием экстрактивных веществ отличалось лекарственное сырье четырехлетних растений почвенного контроля (66.1%), превышая в 1.5 раз растения, выращенные на гравии и вулканическом шлаке того же возраста, и дикорастущие растения Севана и Гарни.

Таким образом, из результатов фитохимических исследований выяснилось, что условия культивирования, вид гидропонического наполнителя, возраст растений, а также условия внешней среды, несомненно, влияют на динамику накопления БАВ. Выявлено, что гидропоническое лекарственное сырье выделялось высоким содержанием флавоноидов и антраценпроизводных. Высокими показателями БАВ отличались четырехлетние растения, а оптимальным гидропоническим наполнителем оказался вулканический шлак. Следует отметить, что все исследуемые варианты лекарственного сырья по качеству соответствовали требованиям ГФ.

Антирадикальная активность экстрактов лекарственного сырья *H. perforatum*.

Антирадикальная активность экстрактов *H. perforatum* определялась по скорости восстановления ДФПГ. Установлена положительная АРА экстрактов как гидропонического лекарственного сырья, так и почвенного контроля (табл. 5).

Таблица 5

Скорость проявления антирадикальной активности экстрактов *H. perforatum*, %

Условия выращивания	Экстракт, мг	Время проявления реакции, минута			
		1	5	20	40
Гидропоника	2	40.0±1.4	70.0±1.0	71.0±1.0	71.0±1.0
	6	57.5±1.2	80.0±1.0	80.0±1.0	80.0±1.0
Почва (контроль)	2	27.5±1.5	52.5±1.5	67.5±0.4	67.5±0.4
	6	36.5±1.3	72.5±1.5	92.5±1.0	92.5±1.0

Из результатов проведенных анализов выяснилось, что все испытанные образцы показали выраженную АРА, но отличались друг от друга по скорости проявления реакции. АРА в обоих испытанных образцах наблюдается с первой же минуты взаимодействия. При концентрации экстракта в 6 мг у почвенного контроля АРА достигала максимума – 92.5% к 20-й минуте, а у гидропонического варианта АРА проявлялась быстрее, достигая максимума – 80.0% к 5-й минуте. При использовании 2 мг экстракта АРА во всех испытанных образцах проявлялась к 20-й минуте: в случае гидропонического варианта АРА достигала максимума – 71%, а у контрольного варианта – 67.5%. АРА во всех испытанных вариантах сохранялась на высоком уровне до 40-й минуты.

Таким образом, основываясь на данных фитохимических анализов исследуемых экстрактов, можно предположить, что выраженная АРА лекарственного сырья *H. perforatum* обусловлена богатым составом биологически активных компонентов, в основном, фенольными соединениями: флавоноидами, производными антрацена (гиперицин, псевдогиперицин) и гиперфорином.

Радиохимические показатели лекарственного сырья. Проведенными исследованиями выявлено, что при одинаковом радиоэкологическом напряжении условия выращивания значительно повлияли на накопление РН в растениях *H. perforatum*. Результаты, представленные в таблице 6, показывают, что по содержанию как естественных (U), так и искусственных (⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs) РН почвенное лекарственное сырье превышало гидропоническое: при наполнителе гравий в 1.1; 1.1; 1.8, а при вулканическом шлаке – в 1.1; 1.3; 1.7 раза соответственно. Как в гидропоническом, так и в почвенном лекарственном сырье содержание ¹³⁷Cs превосходило ⁹⁰Sr, причем в почвенном его в 3.4 раза больше. Лекарственное сырье, полученное на обоих гидропонических наполнителях (гравий, вулканический шлак), по содержанию ¹³⁷Cs существенно не различалось, а по содержанию

^{90}Sr растения, выращенные на гравии, в 1.2 раза превосходили растения, выращенные на вулканическом шлаке.

Таблица 6

Содержание естественных и искусственных радионуклидов в лекарственном сырье *H. perforatum*

Условия выращивания	Наполнитель	U·10 ⁻⁶ %	^{90}Sr	^{137}Cs
			Бк/кг	
Гидропоника	гравий	0.61	7.0	14.6
	вулканический шлак	0.66	5.8	14.7
Почва (контроль)		0.70	7.6	25.8
ПДК		---	100	400

Важным радиоэкологическим показателем качества лекарственного сырья является суммарная β -радиоактивность, и в ней доли ^{90}Sr и ^{137}Cs наиболее опасные для человеческого организма (табл. 7).

Таблица 7

Радиохимические показатели лекарственного сырья *H. perforatum*

Условия выращивания	Наполнитель	Суммарная β -активность, Бк/кг	Доля РН в суммарной β -активности, %		
			^{90}Sr	^{137}Cs	другие РН
Гидропоника	гравий	300	2.3	4.9	92.8
	вулканический шлак	300	1.9	4.9	93.2
Почва (контроль)		260	2.9	9.9	87.2

Из показателей суммарной β -радиоактивности видно, что условия выращивания влияют на накопление радиоактивных веществ в растениях. В почвенных растениях доля ^{137}Cs в 2 раза превышает гидропонические. Доля ^{90}Sr и ^{137}Cs в суммарной β -радиоактивности в растениях, выращенных на гравии, в 1.8, а на вулканическом шлаке в 1.9 раза меньше почвенных (12.8%). В зависимости от условий культивирования, в полученном лекарственном сырье доля ^{90}Sr и ^{137}Cs в суммарной β -радиоактивности составила следующий убывающий ряд: почва > гравий > вулканический шлак. Известно, что суммарная β -радиоактивность обусловлена не только содержанием ^{90}Sr и ^{137}Cs , которые в растениях составляют малый процент, но и рядом других искусственных и естественных РН. Можно предположить, что в условиях гидропоники источником проникновения в растения искусственных РН служили исходная артезианская вода и химические соли, применяемые для приготовления питательного раствора, а в условиях почвы – оросительная вода (река Раздан) и почва, хотя основным источником загрязнения РН как в открытой гидропонике, так и в почве является воздушная среда (пыль, атмосферные осадки и др.).

Таким образом выявлено, что в гидропоническом лекарственном сырье *H. perforatum* содержание естественных и искусственных РН ниже, по сравнению с почвенным. Независимо от условий культивирования, содержание ^{90}Sr и ^{137}Cs не превышало ПДК и соответствовало радиоэкологическим международным требованиям. Следовательно, можно сказать, что гидропоническое лекарственное сырье радиоэкологически более чистое, чем почвенное.

Содержание тяжелых металлов в лекарственном сырье. Показано, что на накопление ТМ в растениях влияют не только способы выращивания, но и почвенно-климатические и экологические условия произрастания. Надо отметить, что из исследуемых тяжелых металлов – Zn, Mn, Cu, Co и Mo являются биометаллами и входят в исходный

состав питательного раствора Г.С. Давтяна. Исследованиями выявлено, что характер накопления ТМ в изучаемом лекарственном сырье одинаковый. Гидропоническое лекарственное сырьё, полученное на обоих изучаемых наполнителях (вулканический шлак и гравий), по общему ряду убывания концентраций ТМ не отличалось друг от друга: $Mn > Ti > Zn = Cu > Mo > V > Ni > Sn > Cr > Co > Ag$.

Таблица 8

Содержание тяжелых металлов в дикорастущем и в культивируемом лекарственном растительном сырье *H. perforatum*, мг/кг

ТМ	Гидропоника		Почва			ПДК
	вулканический шлак	гравий	Ереван (контроль)	Севан	Гарни	
Mn	10.79	15.5	29.46	12.05	14.48	12
Ni	0.30	0.4	1.64	1.31	1.90	0.5
Co	0.08	0.1	0.03	0.03	0.04	0.5
Ti	5.84	8.7	2.19	15.81	10.86	---
V	0.44	0.7	0.16	0.48	0.58	---
Cr	0.08	0.2	1.64	0.37	0.67	0.2
Mo	0.80	0.90	0.39	2.82	0.58	1.0
Cu	2.51	3.62	3.92	3.20	4.52	10
Pb	не обнаружен	не обнаружен	не обнаружен	0.12	не обнаружен	10
Ag	0.05	0.06	0.02	0.01	0.08	---
Zn	2.51	3.62	9.42	3.7	14.48	10
Sn	0.25	0.27	0.16	0.37	0.19	2.0
Сумма	23.65	33.99	49.03	40.27	48.38	---

Однако, растения выращенные на гравии, по отдельным и суммарным концентрациям ТМ превышали растения вулканического шлака: по содержанию Mn, Ti, Cu и Zn в 1.4; 1.5; 1.4 и 1.4 раза соответственно, а по суммарной концентрации – в 1.4 раза, (табл. 8). Наименьшее суммарное количество ТМ (23.65 мг/кг) обнаружено в растениях, выращенных в условиях гидропонии на вулканическом шлаке, а наибольшее (49.03 мг/кг) – в контрольных растениях. Контрольные растения по содержанию ТМ примерно в 2 раза превосходили гидропонические, и в 1.2 раза – дикорастущие растения с окрестностей Севана. Содержание некоторых ТМ, в частности Mn, Ni и Cr, в контрольных растениях превосходило ПДК в 2.4; 3.3; 8.2 раза соответственно. Содержание Zn превосходило ПДК в 1.4 раза только в образцах из Гарни, а Mo – в 2.8 раза в лекарственном сырье из Севана. В дикорастущих растениях из Севана и Гарни содержание Ni превышало ПДК в 2.6 и в 3.8 раза соответственно. Наиболее опасный Pb обнаружен только в сырье из окрестностей Севана. По содержанию Ni, Ti, Cr, Mo, Cu, Sn и Zn дикорастущее лекарственное сырье из Севана и Гарни превышало гидропонические растения. Наиболее высокое содержание Ti обнаружено в растениях Севана (15.81 мг/кг) и Гарни (10.86 мг/кг), что превышало растения вулканического шлака в 2.7 и 1.9 раза, гравия – в 1.8 и 1.2 раза и контрольного варианта в 7.2 и 4.9 раза соответственно. Анализ полученных данных показал, что содержание ТМ в лекарственном сырье, выращенном на гидропоническом наполнителе вулканический шлак, низкое и не превышало ПДК по сравнению с остальными исследуемыми вариантами. Лекарственное сырье, полученное на наполнителе гравий, только по содержанию Mn (15.5мг/кг) в 1.3 раза превышало ПДК.

Таким образом, по содержанию ТМ гидропоническое лекарственное сырьё уступает почвенному, и соответствует требованиям международного стандарта. Следовательно, для получения лекарственного сырья *H. perforatum* применение гидропонического метода с использованием гидропонического наполнителя вулканический шлак с экологической точки зрения более целесообразно.

3. Экономическая эффективность культивирования *Hypericum perforatum* сопряжённым методом культуры *in vitro* и гидропоники. В работе проведён ориентировочный экономический расчёт гидропонического производства растительного лекарственного сырья *H. perforatum* с использованием посадочного материала, полученного в культуре *in vitro*. При расчёте прибыли учитывался уровень мировых цен на аналогичную продукцию, максимальный объем производимой продукции для данной площади. При расчёте затрат учитывалась материальная стоимость, фонд оплаты труда и начисления на заработную плату, стоимость коммунальных платежей, амортизационных отчислений на оборудование и т.д. Общая сумма затрат лаборатории "Культуры ткани" (20 м²) за год составляет 8 400 000 драм. На 1 м² производительной лабораторной площади светокультурного стеллажа помещается до 600 пробирочных микрорастений и ежегодно с 1 м² можно получить до 6000 микрорастений *H. perforatum*. Себестоимость 1 растения равна 70 драмам. Цена растений может варьировать в зависимости от цены используемых расходных материалов, реактивов, объема продукции, заработной платы.

Расчёты годовых расходов при эксплуатации 1 га открытой гидропонической плантации составили 17 553 400 драм. Поскольку *H. perforatum* многолетнее растение, и гидропоническую плантацию можно возделывать 5 лет, тогда из расходов последующих годов эксплуатации гидропоники нужно вычесть себестоимость посадочного материала (*in vitro* микрорастения) – 3 500 000 драм. Для расчёта дохода гидропонического производства лекарственного сырья использовали среднее значение расходов эксплуатации (14753400 драм) за 5 лет.

Средний урожай воздушносухого лекарственного сырья (за 5 лет возделывания), при гидропоническом культивировании растений с использованием наполнителя - гравий, с 1 га составил 44.22 ц/га. На международном рынке розничная цена 1 кг воздушносухого лекарственного сырья *H. perforatum* равна от 8000–10000 драм, а оптовая цена – 6000 драм. При расчёте средних данных за 5 лет возделывания себестоимость 1кг гидропонического лекарственного сырья составляет 3336.4 драм. Таким образом, при производстве воздушносухого лекарственного сырья с 1 га гидропонической плантации, при использовании гидропонического субстрата гравия, чистый годовой доход составляет 11 778 600 драм, а уровень рентабельности по себестоимости – 79.8%.

Следовательно, применение сопряженного метода культуры *in vitro* и гидропоники для выращивания ценных растений и внедрение разработанной биотехнологии в практику сельского хозяйства приведет к значительной интенсификации труда, повышению его эффективности, обеспечит экономию труда и материальных расходов, что может способствовать усовершенствованию производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из необходимости более глубокого познания биологии роста и развития *H. perforatum*, с целью получения качественного лекарственного сырья, нами проведены исследования по установлению оптимальных физиолого-агротехнологических условий беспочвенного культивирования растений на основе внедрения технологии клонального микроразмножения *in vitro*. Во многих странах по отдельности применяются как методы культуры *in vitro*, так и гидропоники, обеспечивающие существенно - положительные результаты. Однако, основываясь на результатах наших исследований, выяснено, что сопряженный метод позволяет, путем оздоровления посадочного материала и эффективного промышленного возделывания культур в управляемых условиях, не только повысить их продуктивность, но и улучшить качество лекарственного сырья. Предложенный нами

сопряженный метод клонального микроразмножения и гидропоники для производства лекарственного сырья основан на использовании питательной среды МС с различными соотношениями ростовых гормонов, а в открытой гидропонике – питательного раствора, предложенного Г.С.Давтяном, и наполнителей твердой фазы субстрата – гравия и вулканического шлака, доступных и относительно дешёвых в Армении. Сопряжённый метод культуры *in vitro* и гидропоники особенно рекомендуется для применения в малоземельных странах с засушливым климатом, позволяя использовать непригодные для сельского хозяйства земли.

Выявлено, что культуре *in vitro* образование каллусной ткани на среде МС происходит в широком диапазоне концентраций регуляторов роста, при сочетании БАП 0.5 – 6.0 и ИУК 0.5 – 6.0 мг/л среды. Все изученные экспланты из вегетативных органов микрорастений (лист, стебель, корень, почка) образовали первичный каллус и обладали способностью образовывать адвентивные побеги. Увеличение в питательных средах концентрации ауксина от 3.0 до 6.0 мг/л и уменьшение цитокинина с 2.5 до 0.5 мг/л положительно повлияло на регенеративную активность с образованием множественных побегов на первичном каллусе. Высокой регенеративной активностью обладал листовой эксплант, а низкой – корневой. Для инициации адвентивных побегов оптимальными оказались концентрации регуляторов роста ИУК и БАП при соотношении: 6.0 и 0.5; 5.0 и 1.0; 4.0 и 1.5; 3.5 и 2.0; 3.0 и 2.5 мг/л соответственно. Побеги-регенеранты размножались клонально с использованием питательной среды МС с половинным содержанием микро - и макроэлементов, с добавлением 0.1 мг/л ИМК. Все регенеранты обладали ризогенной активностью. Поскольку в неорганизованных каллусных культурах часто возникают мутации, приводящие к генетической нестабильности, следовательно для дальнейшего размножения и получения стандартного посадочного материала целесообразно в качестве основного материала использовать микрорастения, размноженные микроразмножением из проростков, отличавшихся более высокой жизнеспособностью. Микрорастения, выращенные из апикальных микрочеренков, в 1.3 раза по развитию превышали микрорастения без апекса и обладали большей ризогенной активностью (98%). Установлена возможность круглогодичного микроразмножения растений и получения с одного индивидуума более миллиона микрорастений в год.

Акклиматизированные микрорастения при пересадке в гидропонические условия лучше адаптировались на гидропоническом наполнителе вулканический шлак– 78%, и в почве– 70%, а на гравии– 50%. Благоприятный микроклимат гидропонической установки и пористая структура вулканического шлака, где поддерживается необходимая влажность, дают возможность сократить адаптационный период и при пересадке микрорастений, без предварительной акклиматизации, на субстрат вулканический шлак приживаемость составила 75%.

Основы возделывания *H. perforatum* традиционным и гидропоническим способами сходны, однако гидропоника имеет ряд преимуществ: с единицы площади от 2-х до 6-ти раз увеличивается урожайность растений, до 40 – 50% сокращаются расходы воды и труда, существенно ускоряется рост и развитие растений, бутонизация и цветение наступает на 10–15 дней раньше, по сравнению с почвенными растениями. В гидропонике оптимальным наполнителем оказался гравий, а максимальный урожай получен с трехлетних растений.

Фитохимическими исследованиями лекарственного сырья выявлено, что условия культивирования, вид гидропонического наполнителя и возраст растений несомненно влияют на динамику накопления БАВ. Гидропонические растения, выращенные на наполнителе гравий, выделялись высоким содержанием гиперфорина (12.23 мг/г). Его содержание было в 1.8 раза больше, чем в сырье, выращенном на вулканическом шлаке, и в 2.7 раза больше почвенного контроля. Высокие показатели гиперидина (0.8 мг/г)

наблюдались в сырье контрольного варианта, превышающем его количества в сырье полученном на вулканическом шлаке и гравии в 1.5 и 5 раз соответственно. Высоким содержанием псевдогиперицина (0.4 мг/г) и суммы флавоноидов (3.8 – 4.3%) выделялись растения вулканического шлака. Следует отметить, что полученное лекарственное сырье *H. perforatum* соответствовало требованиям ГФ. Выяснилось, что все испытанные варианты экстрактов из лекарственного сырья *H. perforatum* проявили выраженную АРА. Можно предположить, что АРА *H. perforatum* обусловлена, в основном, фенольными соединениями: флавоноидами, производными антрацена (гиперинин, псевдогиперинин), гиперфорином. Радиохимическое изучение показало, что независимо от условий культивирования (гидропоника, почва), в лекарственном сырье содержание искусственных РН (^{90}Sr , ^{137}Cs) не превышало ПДК и соответствовало радиоэкологическим международным требованиям. Однако гидропоническое лекарственное сырье по содержанию естественных и искусственных РН уступает почвенным, и экологически более чистое. Исследования лекарственного сырья на содержание ТМ показали, что наименьшее их количество обнаружено в гидропонических растениях, выращенных на наполнителе вулканический шлак, а наибольшее – в почвенных (контроль-Ереван), которые примерно в 2 раза превосходили гидропонические и в 1.2 раза – дикорастущие растения с окрестностей Севана. Анализ полученных данных показал, что гидропоническое лекарственное сырье по содержанию ТМ не превышало ПДК.

Оценка экономической эффективности сопряженного метода культуры *in vitro* и гидропоники свидетельствует о его высокой рентабельности при производстве воздушносухого лекарственного сырья *H. perforatum*.

Таким образом, сопряженный метод клонального микроразмножения *in vitro* и гидропоники является эффективной для ускоренного размножения посадочного материала *H. perforatum* и получения высоких урожаев качественного лекарственного сырья. Устройство культивируемых плантаций *H. perforatum* имеет важное экологическое значение, являясь дополнительным способом охраны природных ресурсов этого ценного вида.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При открытом гидропоническом производстве *H. perforatum* посадку целесообразно проводить в апреле месяце, когда температура воздуха достигает 12 – 15°C, с нормой посадки 5–6 растений на 1 м². В качестве посадочного материала использовать четырехмесячные микрорастения с хорошо развитой корневой системой. С целью экономии времени и материальных затрат рекомендуется пересаживать микрорастения в условия открытой гидропоники без предварительной акклиматизации, с использованием наполнителя вулканического шлака. В условиях открытой гидропоники с целью получения высокого урожая лекарственного сырья целесообразно выращивать *H. perforatum* на гидропоническом наполнителе гравий, а для получения растений с в низким содержанием РН и ТМ целесообразнее использовать вулканический шлак. В природоохранных целях предлагается создавать гидропонические культивируемые плантации *H. perforatum*.

ВЫВОДЫ

1. Установлена возможность получения изолированных культур *H. perforatum* в культуре *in vitro*.

2. Выявлено влияние фитогормонов питательной среды на морфогенез и регенеративную активность каллусных тканей, инициированных из различных эксплантов. Увеличение концентрации ауксина с 3.0 до 6.0 мг/л и уменьшение цитокининов с 2.5 до 0.5 мг/л стимулировало регенерацию адвентивных побегов на первичном каллусе.

3. Установлена возможность круглогодичного микроклонального размножения *H. perforatum* и получения однородного посадочного материала с коэффициентом размножения – 9.

4. С целью корнеобразования использована питательная среда МС с половинной концентрацией микро- и макроэлементов и 0.1 мг/л ИМК.

5. Установлена эффективность акклиматизации микрорастений в гидропонических и почвенных условиях с 70 – 78% приживаемости и без предварительной акклиматизации микрорастений, с использованием гидропонического наполнителя вулканический шлак, с 75% приживаемости.

6. Выявлено, что на рост и развитие *H. perforatum* влияют условия культивирования. В условиях открытой гидропонике, со второго года культивирования бутонизация и цветение растений наступает на 15 – 20 дней раньше, по сравнению с почвенным контролем.

7. Выявлено, что вид гидропонического наполнителя и возраст растения оказывает существенное влияние на продуктивность. Оптимальным наполнителем для выращивания *H. perforatum* оказался гравий, где получен максимальный урожай лекарственного сырья. Высокой урожайностью выделялись трехлетние растения.

8. Выявлено, что динамика накопления БАВ в *H. perforatum* зависит от условий выращивания, фазы развития, возраста растений. Лекарственное сырьё *H. perforatum*, выращенное сопряженным методом культуры *in vitro* и гидропонике выделяется высокими показателями суммы флавоноидов, антраценпроизводных, гиперфорина и по качеству соответствует международным стандартным требованиям ГФ. Сравнительно высокое содержание суммы флавоноидов обнаружено в четырехлетних растениях.

9. Установлена положительная АРА экстрактов как гидропонического растительного сырья, так и почвенного контроля.

10. Выявлено, что в зависимости от условий культивирования в полученном лекарственном сырье доля ^{90}Sr и ^{137}Cs в суммарной β -радиоактивности составила следующий убывающий ряд: почва > гидропоника (гравий) > гидропоника (вулканический шлак). Гидропоническое и почвенное лекарственное сырьё *H. perforatum* по содержанию контролируемых искусственных РН (^{90}Sr , ^{137}Cs) не превышает ПДК и соответствует радиэкологическим международным требованиям. Гидропоническое лекарственное сырьё с экологической точки зрения более чистое.

11. Выявлено, что наименьшее количество ТМ обнаружено в гидропонических растениях, выращенных на наполнителе вулканический шлак, а наибольшее – в почвенных, которые примерно в 2 раза превосходили гидропонические, и в 1.2 раза – дикорастущие растения с окрестностей Севана. В гидропоническом лекарственном сырье содержание ТМ не превышало ПДК, хотя в почвенном контроле содержание Mn, Ni и Cr превосходило ПДК.

12. При производстве воздушносухого лекарственного сырья *H. perforatum* с 1 га гидропонической плантации, при использовании гидропонического субстрата гравия, чистый годовой доход составляет 11 778 600 драм с рентабельностью по себестоимости 79.8%.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Варданян А.П. Получение растительного лекарственного сырья зверобоя сопряженным методом культуры *in vitro* и гидропоники. // Материалы XIV Международного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье»- 2-й съезд селекционеров, Симферополь, 2005, с. 722–723.

2. Саркисян Э.Д., Варданян А.П. Разработка биотехнологии культивирования зверобоя продырявленного и получения лекарственного сырья. // Материалы международной конференции: “Успехи биотехнологии: перспективы развития в Армении” посвященной 35-летию “НИИ Биотехнологии”, Ереван, 2006, с. 203.

3. Саркисян Э.Д., Варданян А.П. Оздоровление и ускоренное размножение посадочного материала растений сопряженным методом гидропоники и клонального микроразмножения в культуре *in vitro*. // Материалы XV Международного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье»-3-й съезд селекционеров, Симферополь, 2006, с. 358–359.

4. Варданян А.П., Саркисян Э.Д. Культивирование зверобоя продырявленного сопряженным методом клонального микроразмножения и гидропоники. // Материалы международной научной конференции, посвященной 75-летию основания Государственного аграрного университета Армении, ГАУА, Ереван, 2006, с. 97–100.

5. Майрапетян С.Х., Саркисян Э.Д., Варданян А.П. Гидропонический метод производства экологически чистой продукции. // ИЗВЕСТИЯ Государственного аграрного университета Армении, Ереван, 2008, №1 (21), с. 29–32.

6. Մարգարյան Է., Վարդանյան Ա., Ղալաշյան Լ. Ծակոտկեն սրտհունդի մշակույթը հիդրոպոնիկ կայուն: // Միջազգային գիտաժողովի նյութեր «Էկոլոգիայի և բնության պահպանության կարևորությունը կայուն զարգացման հեռանկարում», Երևան, 2008, էջ 75:

7. Варданян А.П. Сопряженный метод культуры *in vitro* и гидропоники для сохранения природных ресурсов *Hypericum perforatum*. // Флора. Растительность. Растительные ресурсы Армении. Ереван, 2009, Вып. №17, с. 108–110.

8. Калачян Л.М., Варданян А.П., Саркисян Э.Д. Сравнительные данные накопления радионуклидов в зверобое продырявленном в условиях открытой гидропоники и почвы. // ИЗВЕСТИЯ Государственного аграрного университета Армении, Ереван, 2009, №3 (27), с. 27–30.

9. Vardanyan A.P., Sargsyan E.D. The study of biologically active substances of *Hypericum perforatum* L. cultivated by *in vitro* culture and hydroponics combined method. // The New Armenian Medical Journal, YSMU, Yerevan, 2010, V.4, №3, p.125.

10. Варданян А.П., Саркисян Э.Д., Калачян Л.М., Чарухчян М.В. Накопление тяжелых металлов в лекарственном сырье зверобоя продырявленного в условиях открытой гидропоники и почвы. // ИЗВЕСТИЯ Государственного аграрного университета Армении, Ереван, 2011, №2 (34), с. 20–22.

11. Sargsyan E., Vardanyan A., Bulgadaryan S. Role of medicinal plants for radiation safety. // Proceedings of International Conference «Radiation Safety Challenges in the 21st Century», Yerevan, 2012, p. 98–101.

12. Vardanyan A., Sargsyan E., Bulgadaryan S. Radioecological evaluation of hydroponic medicinal raw material of *Hypericum perforatum* L. // Abstract book of 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, Italy, 2012, p. 164.

Վարդանյան Անուշ Պետրոսի

HYPERICUM PERFORATUM L. ՄՇԱԿՈՒՄԸ *IN VITRO* ԵՎ ՀԻՂՐՈՊՈՆԻԿ ՀԱՄԱԿՑՎԱԾ ՄԵԹՈԴՈՂ

ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բաղեղ՝ *H. perforatum L., in vitro*, Մուրասիգե-Սկուզի սննդամիջավայր, ԻՔԹ, ԲՄՊ, հիդրոպոնիկա, ֆլավոնոիդներ, անտրացենածանցյալներ, ռադիոնուկլիդներ, ծանր մետաղներ

Ատենախոսությունը նվիրված է *in vitro* և հիդրոպոնիկ համակցված մեթոդով արժեքավոր դեղաբույս ծակոտկեն սրոհունդի (*Hypericum perforatum L.*) մշակման պայմանների ուսումնասիրությանը: Դեղաբույսը պարունակում է հիպերիցին, պսևդոհիպերիցին, հիպերֆորին, ֆլավոնոիդներ, դաբաղանյութեր և այլ կենսաբանական ակտիվ նյութեր, որոնցով պայմանավորված է *H. perforatum* հակավիրուսային, հակարետրովիրուսային, հակաբակտերիալ, հակաօքսիդանտային, հակաքաղցկեղային, հակաբորբոքային, հակադեպրեսիվ և այլ բուժական հատկությունները:

Աշխատանքի հիմնական նպատակը ծակոտկեն սրոհունդի ներմուծումն է *in vitro* և հիդրոպոնիկ կառավարվող պայմաններ, բարձրորակ տնկանյութ և դեղահումք աճեցնելու համար:

In vitro պայմաններում տնկանյութի արագ բազմացման նպատակով սերմերից ստացվել են միկրոբուսակներ, տարբեր էքսպլանտներից (տերև, ցողուն, բողբոջ, արմատ)՝ կալլուսային հյուսվածքներ և բույս-ռեգեներանտներ: Աճեցվող հյուսվածքների համար ընտրվել են ինտենսիվ աճը ապահովող պայմաններ: Հետազոտվել է առանձին հորմոնալ գործոնների և դրանց տարբեր համադրությունների ազդեցությունը կալլուսային հյուսվածքների ինդուկցիայի և մորֆոգենեզի խթանման վրա: Բոլոր փորձարկված էքսպլանտները առաջացրել են կալլուսային հյուսվածքներ, իսկ Մուրասիգե-Սկուզի (ՄՍ) սննդամիջավայրում աուքսինի (ԻՔԹ) խտության բարձրացումը 3.0–6.0 մգ/լ և ցիտոկինինի (ԲՄՊ) խտության նվազեցումը 0.5–2.5 մգ/լ խթանել է առաջնային կալլուսի ընձյուղառաջացումը: Բույս-ռեգեներանտները և միկրոբուսակները բազմացվել են միկրոկտրոնավորմամբ, ՄՍ-ի միկրո- և մակրո աղերի կիսով չափ նոսրացված սննդամիջավայրում, որտեղ ԻԿԹ-ի 0.1 մգ/լ խտությունը ապահովել է արմատառաջացում: Պարզվել է, որ բույսի վերին հարկաշարքից վերցված միկրոկտրոններն ունեն ավելի բարձր (98 %) ռիզոգեն ակտիվություն և *H. perforatum* միկրոբազմացումը հնարավոր է կլոր տարի:

Նախապես կլիմայավարժեցված միկրոբուսակները հիդրոպոնիկայի բարենպաստ պայմաններում ապահովել են 70 – 78 %, իսկ հրաբխային խարամ

լցանյութի դեպքում, առանց կլիմայավարժեցման՝ 75 % կաչոդականություն: Բացօթյա հիդրոպոնիկայի կառավարվող պայմաններում բույսերի աճի և զարգացման փուլերն ավելի ինտենսիվ են ընթացել և համեմատած հողային ստուգիչի հետ, ծաղկման փուլը, հետևաբար և բերքահավաքը սկսվել է 10 – 15 օր շուտ: Հիդրոպոնիկ պայմաններում բույսերի բերքատվությունը 1.4 մինչև 6.2 անգամ գերազանցել է հողային ստուգիչին: Պարզվել է, որ *H. perforatum* բերքատվությունը կախված է աճեցման պայմաններից և բույսերի տարիքից: Դեղահումքի առավելագույն բերք ստացվել է գլաքար լցանյութի վրա աճեցված երեք տարեկան բույսերից:

Պարզվել է, որ *H. perforatum* կենսաբանական ակտիվ նյութերի սինթեզման դինամիկան կախված է մշակման պայմաններից, բույսի զարգացման փուլից և բույսերի տարիքից: Կենսաբանական ակտիվ նյութերի բարձր պարունակությամբ աչքի են ընկել հիդրոպոնիկ բույսերը: Գոմարային ֆլավոնոիդների և անտրացենածանցյալների բարձր պարունակություն գրանցվել է հրաբխային խարամ լցանյութի վրա աճեցված բույսերում, իսկ հիպերֆորինի առավելագույն պարունակություն՝ գլաքար լցանյութի դեպքում: Գոմարային ֆլավոնոիդների համեմատաբար բարձր պարունակությամբ աչքի են ընկել չորս տարեկան բույսերը:

H. perforatum դեղահումքից ստացված էքստրակտները ցուցաբերել են բարձր հակառադիկալային ակտիվություն, որն ամենայն հավանակությամբ, պայմանավորված է ֆենոլային միացություններով:

Ռադիոքիմիական ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ անկախ մշակման պայմաններից, դեղահումքում ^{90}Sr և ^{137}Cs մասնաբաժինը գոմարային β -ռադիոակտիվության մեջ կազմել է հետևյալ նվազող շարքը՝ հող > հիդրոպոնիկա (գլաքար) > հիդրոպոնիկա (հրաբխային խարամ): Հիդրոպոնիկ դեղահումքը բնական (U) և արհեստական (^{90}Sr , ^{137}Cs) ռադիոնուկլիդների պարունակությամբ զիջել է հողայինին և էկոլոգիապես ավելի մաքուր է: Բոլոր հետազոտվող բուսահումքի տարբերակներում վերահսկվող արհեստական ռադիոնուկլիդների պարունակությունը չի գերազանցել սահմանաթույլատրելի խտությունը (ՄԹԽ):

Ծանր մետաղների ամենացածր պարունակություն դիտվել է հրաբխային խարամ լցանյութի վրա աճեցված դեղահումքում, իսկ ամենաբարձր՝ հողային բուսահումքում: Ծանր մետաղների պարունակությունը հիդրոպոնիկ դեղահումքում, համեմատած հողային ստուգիչի (Երևան) և Սևանի ու Գառնիի շրջակայքերից հավաքված վայրի դեղահումքի հետ, չի գերազանցել ՄԹԽ:

Հաստատվել է *in vitro* և հիդրոպոնիկ համակցված մեթոդի տնտեսական արդյունավետությունը և հեռանկարայնությունը էկոլոգիապես մաքուր դեղահումքի ստացման համար: *H. perforatum* բարձրորակ տնկանյութով մշակովի տարածքների ստեղծումը թույլ կտա կրճատել դեղաբույսի անվերահսկելի մթերումը վայրի կենսահամակեցություններից:

**CULTIVATION OF *HYPERICUM PERFORATUM* L. BY *IN VITRO* AND
HYDROPONICS COMBINED METHOD**

SUMMARY

Key words: *H. perforatum* L., *in vitro*, nutrient medium of Murashige-Skoog, IAA, BAP, hydroponics, flavonoids, anthracene derivatives, radionuclides, heavy metals

This dissertation reports studies of culture conditions of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by a combined method of *in vitro* and hydroponics. *H. perforatum* contains hypericin, pseudohypericin, hyperforin, flavonoids, tannins and other biological active substances, which determine its antiviral, antiretroviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, sedative, anti-depressive and other medicinal properties.

The main objective of this research is to introduce *H. perforatum* in *in vitro* and hydroponic culture and to cultivate it in the controlled conditions in order to receive quality planting and medicinal raw material.

For rapid propagation of planting material *in vitro*, microplants were obtained from seeds, and callus and plant-regenerants were obtained from different explants (leave, stem, bud and root). Specific *in vitro* conditions that lead to more intensive growth of tissues have been selected. The influence of different hormonal factors, and their various concentrations and combinations, on callus growth and induction of morphogenesis has been investigated. All tested explants were able to generate callus; the high concentration of auxin (IAA) 3.0 – 6.0 mg/l and the low concentration of cytokine (BAP) 0.5 – 2.5 mg/l in the nutrient medium of Murashige-Skoog (MS) stimulated the shoot regeneration on the primary callus. Micro-plants and shoot-regenerants have been multiplied by micro-cutting on the MS nutrient medium with the half content of micro- and macro-elements, with low concentration of IBA (0.1 mg/l) stimulating the rooting. Apical micro-cuttings had higher (98 %) rizogenic activity. It was determined that micro-propagation of *H. perforatum* is possible throughout a year.

Hydroponics creates favorable conditions for the acclimatization of micro-plants by providing 70 – 78 % adaptation. Hydroponics conditions on the volcanic slag substrate allowed for shortening of acclimatization period and obtained 75 % adaptation of micro-plants. In open-air

hydroponics conditions, the plant growth and development was accelerated and in comparison with the soil plants flowering phase began 10 – 15 days earlier. Culture conditions, hydroponic substrate and the plant age influenced the productivity of plants. The maximum yield of medicinal raw materials was received from three years old plants on gravel hydroponic substrate.

Dynamics of accumulation of biologically active substances in *H. perforatum* was related to conditions of cultivation, phases of development and age of the plant. The hydroponic plants had with high content of biologically active substances. The medicinal raw material from plants grown on the substrate of volcanic slag had the highest content of sum of flavonoids and anthracene derivatives, while those grown on gravel substrate had the highest content of hyperforin. Four years old plants had the highest sum of flavonoids.

Both hydroponic and soil grown plant extracts demonstrated positive antiradical activity. All tested samples showed high antiradical activity which most probably is due to phenol compounds.

Radiochemical testing showed that depending on the conditions of cultivation, the proportion of ^{90}Sr and ^{137}Cs of β -activity in the cultivated medicinal raw material was descending in the following order: soil > hydroponics (gravel) > hydroponics (volcanic slag). The content of artificial (^{90}Sr , ^{137}Cs) and natural (U) radionuclids in hydroponic plants was less compared to soil-grown plants. The content of controlled artificial radionuclides in all tested samples of medicinal raw material did not exceed the Maximum Allowed Concentration (MAC).

The least quantity of heavy metals was measured in plants hydroponically cultivated on volcanic slag and the largest quantity was measured in soil-grown plants. The content of heavy metals in hydroponic medicinal plants, unlike in the soil controls (Yerevan) and in wild plants (Sevan and Garni regions), did not exceed the MAC and met standard requirements.

This study demonstrated that the combined method of *in vitro* culture and hydroponics is economically effective for the accelerated propagation of the *H. perforatum* seeding and for obtaining high yields of quality and ecologically pure medicinal raw material. In addition, creation of cultivated plantation of *H. perforatum* will play an important role in reducing uncontrolled collection of wild plants and will be essential for protection of natural resources of these valuable species.