

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՓԱՐՄԱԵԻՄԵՀՐ ԱԼԻ ՀԱՍՍԱՆԻ

ԷՖԵԴՐԱՅԻ ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ, ԴՐԱՆՑ ԵՐԿՐՈՐԴԱՅԻՆ ՄԵՏԱԲՈԼԻՏՆԵՐԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ *IN VITRO*

ՄՇԱԿՈՒՅԹՈՒՄ ԵՎ ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՅԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ

կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի

գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Մ Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

Երևան – 2011

---

ИПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ПАРСАЕИМЕЙР АЛИ ХАССАНОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ ЭФЕДРЫ, ИХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРЕ

*IN VITRO* И РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ

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 - 2011

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.Գ. Սարգսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2011 թ. նոյեմբերի 25-ին ժամը 14<sup>00</sup> ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՂ-ի 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 2011 թ. հոկտեմբերի 25-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.н. Г. Г. Саркисян

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 25 ноября 2011 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного совета 018 ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

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

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

Автореферат разослан 25 октября 2011 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Потенциальная возможность изолированных клеток высших растений синтезировать полезные метаболиты была выявлена еще в 1950-ых годах. С того времени для широкомасштабной культивации клеток и продукции ими вторичных метаболитов была разработана техника создания культуры клеток. Очевидно, что будущее биотехнологии в этой области базируется на разработках технологий, позволяющих индуцировать генетические варианты, получать конкретные вторичные метаболиты в нужном количестве и создавать системы культур в соответствии с уникальными требованиями для роста клеток растений (Caretto *et al*, 2010). *Ephedra* (E.) происходит из рода голосеменных, единственного рода в семействе Ephedraceae и порядка Ephedrales, представленного в качестве лекарственного растения (Konar and Singh, 1979). По современным представлениям это удивительное растение используется во всем мире для решения многих медицинских проблем, начиная с простуды и простой лихорадки и заканчивая бронхиальной астмой и сенной лихорадкой. Компоненты этого растения, такие как протоалкалоиды (эфедрин, псевдоэфедрин), таннин, сапонины, флавоны, летучие масла были в круге интересов исследователей благодаря своей потенциальной ценности в фармацевтической области (De-Zhi *et al*, 2004).

**Цели и задачи исследования.** Целью данного исследования явилось: получить каллус из трех видов *Ephedra* (*Ephedra procera* Fisch et C. A. Mey, *Ephedra strobilacea* Bunge, *Ephedra pachyclada* Boiss) в оптимальном диапазоне и найти единственно подходящий для его применения в суспензионной культуре метод, а также и исследовать вторичные метаболиты в *in vitro* культуре и определить оптимальные условия для ее роста и синтеза вторичных метаболитов.

Основными задачами исследования были:

- получение каллуса и суспензионной культуры из *E. procera*, *E. strobilacea*, *E. pachyclada*;
- изучение и определение роста каллуса в различном гормональном диапазоне;
- проведение сравнительного анализа антимикробных и антиоксидантных свойств вторичных метаболитов каллуса и материнского растения;
- проведение сравнительного анализа каллуса и материнского растения по содержанию в них общего фенола;
- определение влияния L-фенилаланина на продукцию эфедрина и псевдоэфедрина, в суспензионной культуре *E. procera*;
- роста клеток *E. procera* в суспензионной культуре и корреляции биосинтеза эфедрина и псевдоэфедрина с pH и параметрами роста под влиянием L-фенилаланина в различном диапазоне (2.5; 5.0; 7.5; 12.5 mM);
- определение подходящего диапазона для применения L-фенилаланина в суспензионной культуре *E. procera*;
- определение содержания эфедрина и псевдоэфедрина в материнских растениях трех выбранных видов;
- создание калибровочной кривой в диапазоне 19-200 мкг/мл для определения концентрации эфедрина и псевдоэфедрина.

**Научная новизна** Впервые в Иране проведены следующие исследования:

- изолированы культуры у видов *Ephedra* (*E. procera*, *E. strobilacea*, *E. pachyclada*);
- установлено взаимосвязь между применяемыми фитогормонами и каллусной индукцией, каллусной биомассой, синтезом эфедрина и псевдоэфедрина и накоплением хлорофилла;
- определена антимикробная активность каллуса и материнского растения против грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов;
- установлена антиоксидантная активность каллуса и материнского растения;
- установлено количество L-фенилаланина, способствующее синтезу эфедрина и псевдоэфедрина в суспензионной культуре *E. procera*.

**Практическая ценность.** Нами разработана подходящая среда для роста клеток *Ephedra* и продуцирования эфедрина и псевдоэфедрина. Наши анализы четко указывают на антимикробные и антиоксидантные свойства *Ephedra* (полученных клеточных культур и диких растений). Таким

образом, в данной работе определены и представлены питательные среды, соответствующие для роста клеток *E. procera* и продуцирования ими эфедрина и псевдоэфедрина. С другой стороны, эта работа четко представляет практическое направление для промышленной деятельности с экономической значимостью, учитывая тот факт, что эфедрин и псевдоэфедрин, будучи вторичными метаболитами, не требуют особых затрат для своего продуцирования, имеют очень широкое применение в фармацевтической промышленности.

На защиту выносятся:

- результаты исследования изолированных культур *Ephedra* (*E. procera*, *E. strobilacea*, *E. pachyclada*) и оптимизации их каллусных культур;
- сравнительный анализ эфедрина и псевдоэфедрина, синтезируемых под воздействием различных гормональных диапазонов для *E. procera* ;
- сравнительный анализ антимикробной и антиоксидантной активности каллуса и материнского растения в отношении грамположительных, грамотрицательных патогенных и непатогенных микроорганизмов и грибов;
- сравнительный анализ суспензионной культуры *E. procera* под влиянием L-фенилаланина;
- сравнительный анализ количеств эфедрина и псевдоэфедрина в материнском растении *Ephedra* (*E. procera*, *E. strobilacea*, *E. pachyclada*).

**Апробация диссертации.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на конференции "Biopharma from Science to Industry", Ереван, Армения, 17-20 мая, 2010; на XIX международном симпозиуме: "Нетрадиционное растениеводство. Селекция и генетика. Экология и здоровье", Алушта, Украина, 12-19 сентября, 2010; на Международной конференции Государственного сельскохозяйственного университета, Ереван, Армения, 21-23 октября, 2010; на Научном Совете Научнопроизводственного центра "Армбиотехнология" НАН РА 1-2 октября, 2010 и Института проблем гидропоники им Г. С. Давтяна НАН РА, Ереван, Армения в течение 2008-2011гг.

**Структура и объем работы.** Настоящая диссертация изложена на 130 страницах печатного текста, и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части с материалами и методами, заключения, выводов и ссылок. Диссертация содержит 29 таблиц, 55 рисунков и 235 ссылок, включая выдержки первоисточников и приложения. Представлены резюме на армянском и английском языках.

**Публикации.** Основные результаты исследований, изложенные в данной диссертационной работе, опубликованные в 5 научных журналах. Исследования проводились на следующих базах: Институт проблем гидропоники имени Г.С.Давтяна НАН РА; Химический научно-исследовательский центр медицинских и натуральных продуктов, Университета медицинских наук, Шираз, Иран.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В течение последних двух десятилетий благодаря технологиям культивирования клеток и тканей растений стало возможно их исследование в качестве заменительного источника для продукции полезных вторичных метаболитов (Vanisree *et al*, 2004). Фактически, в культуре растительных клеток изолированные из целого растения или его отдельных частей клетки культивируются в соответствующих физиологических условиях с последующей экстракцией из них интересующего продукта. Последние разработки в области техники культивирования тканей растений и их переработка показывают обнадеживающие результаты для многократного улучшения продуктивности, применяя надежные средства, такие как культура тканей, генная инженерия и техника анализа с помощью аппаратур: ВЭЖХ, ГХ, масс-ЖХ ..., используемые в данной научной области в последние десятилетия.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**2.1. Подготовка образцов растений.** 3 вида *Ephedra*: *Ephedra procera* Fisch et C. A. Mey, *Ephedra strobilacea* Bunge, *Ephedra pachyclada* Boiss, были собраны с области N 29° 23' E 53° 10'.

**2.2. Индуцирование каллуса.** Стебли растений были поверхностно простерилизованы в гипохлориде натрия (0.5%), содержащего также несколько капель Tween; междузлия в  $0.8 \pm 0.2$  см отделялись от донорского растения и снова поверхностно стерилизовывались в гипохлориде Na (0.25%), содержащего Tween 20. Опыт основывался на полностью рандомизированный дизайн (ПРД) и 25 эксплантах, полученных после обработки и мониторинга в течение нескольких дней. Стандартная питательная среда Murashige and Skoog (MS), по 30 мл в каждой пробирке с различными стимулирующими рост растений регуляторами, такими как 1-нафтил-уксусная кислота (НУК) в качестве ауксина и 6-бензиламинопурина (БАП) и кинетин (Кин) в качестве цитокинов в следующем диапазоне: 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 мг/л, соответственно использовались для каллусной индукции вместе с 30 г/л сахарозы и 7 г/л агаром. pH среды подвигался к 5.8 с помощью 1 N NaOH и 1N HCl до автоклавирования. После чего экспланты, проявляющие каллусную индукцию выдерживались под светом (2500 - 300 люкс) при температуре  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  для тестирования. Субкультуры проводились каждые 4 недели и продолжались до достижения каллусной стабильности. В итоге, после 4-ой субкультуры только лишь один гормональный диапазон выбирался для каждого из трех видов *Ephedra* базируясь на: частоту каллусной индукции, свежую массу после обработки, фенотипы, каллусную стабильность в среде и относительную частоту роста (ОЧР) при обработке. Другие образцы после 4-ой субкультуры выводились из эксперимента, и лишь образцы в диапазоне (мг/л): *E. procera* – НУК: 2.0, Кин: 1.0; *E. strobilacea* – НУК: 1.5, Кин: 1.0; *E. pachyclada* – НУК: 2.0, Кин: 0.5 далее мониторовались, сохранялись, подвергались субкультурированию и подготавливались для тестов. ОЧР определялась для отмеченных видов, применяя следующую формулу:  $\text{ОЧР} = 3(\text{Wf } 1/3 - \text{Wi } 1/3) / \text{tf} - \text{ti}$ , где Wi – начальная масса каллуса Wf – конечная масса каллуса (при tf), t – время,  $\text{tf} - \text{ti} = 28$  дней субкультуривационного периода.

**2.3. Содержание каллусного алкалоида.** Для анализа эфедрина и псевдоэфедрина применялись два метода: ТСХ – тонкослойная хроматография – для быстрого скрининга и подтверждения, и ВЭЖХ, стабилизированный с градиентным методом – для определения содержания эфедрина и псевдоэфедрина в полученных образцах.

**2.3.1. Система ВЭЖХ.** Аппарат ВЭЖХ фирмы Knauer (Германия), состоящий из смарт-системы K – 2600 UV детектора, K – 1001 насоса, K – 1500 органайзера растворителя, on-line дегазатора, динамического смешивателя вместе с Eurosphere 100 – C 18, 5-м,  $250 \times 4$  мм колонками был применен для полноценного анализа экспериментов. Более того, система элюции фосфатного градиента, описанная Sheu et al (2001) также использовалась, а данные представлялись в мкг/г сухого веса.

**2.3.2. Тонкослойная хроматография.** Этот метод, описанный O'Dowd et al (1993) был применен для анализа экстрактов для определения наличия эфедрина и псевдоэфедрина.

**2.4. Определение содержания хлорофилла в *E. procera* каллусной культуре.** Этот метод, описанный Lichtenthaler (1987) и Kouril (1999) применялся для определения содержания хлорофилла с помощью спектрофотометра модели UVIDEC – 660. В качестве образца использовалось 100 мг замороженно-высушенного каллуса.

**2.5. Суспензионная культура в *E. procera*.** Эксперимент основывался на полностью рандомизированном дизайне (ПРД) с пятью обработками (диапазон фенилаланина) и трех повторах в течение 16 дней.

**2.5.1. Инициация суспензионной культуры.** Стабильная клеточная линия была создана из каллуса: 5 г хрупкого каллуса было получено после 6-ой субкультуры при воздействии НУК – 2.0 мг/л, Кин – 1.0 мг/л и было помещено в 100 мл жидкой MS питательной среде с тем же гормональным диапазоном. Далее, адаптированные клетки получались на стационарной фазе на 10-ый день, а пробирки с каллусом подвергались субкультуривации с использованием той же самой среды каждые 12 дней с продолжительностью до 4-ого пассажа. Стационарная фаза определялась с помощью анализа роста клеток в среде с использованием клеточного объема (КО) и сухого веса. В итоге, клеточные линии в партии клеточных культур начинались с 5 г адаптированных клеток в MS стандартной среде с добавлением 30 г/л сахарозы и 2.0 мг/л НУК и 1.0 мг/л Кин.

**2.5.2. Применение L-фенилаланина.** Для проведения сравнительного анализа синтеза эфедрина и псевдоэфедрина с контролем применялись различные концентрации L-фенилаланина (2.5; 5.0; 7.5 и 12.5 мМ) от компании Sigma-Aldrich для свежего веса, сухого веса и КО каллуса. Эксперимент проводился в 5-и обработках и 3-х повторах, после чего приостанавливался на 16-ый день.

**2.5.3. Пачечный клеточный объем (КО).** Этот метод применялся путем центрифугирования 5 мл клеточной суспензии при 2500 оборотов в минуту в течение 5 минут, после чего образцы анализировались в градуированной центрифуге.

**2.5.4. Измерения свежего и сухого веса.** Свежий вес определялся при помощи фильтрации 10 мл раствора, взятого с каждой пробирки, через фильтровальную бумагу Millipore (диаметром в 42 мм), с последующим отсасыванием среды под ламинарным потоком воздуха и взвешиванием образцов. Вес сухого вещества определялся путем замораживания и высушивания в течение 24 часов при температуре  $-45^{\circ}$  (температура конденсатора) и под давлением 0,10 гектопаскаль (гПа), и последующего быстрого и глубокого замораживания при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Соответственно, их данные выражали в г/л.

**2.5.5. Жизнеспособность клеток.** Жизнеспособность клеток определялась при помощи Флюоресцеин Диацетата (ФДА), приготовленного из 0.5% (В/О) в ацетоне и выдержанного при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  (Widholme, 1972).

**2.5.6. Определение pH.** Определение pH проводилось в каждые 2 дня путем анализа 3 мл MS среды pH-метром (после предварительного определения свежего веса путем отделения среды от клеток с помощью аппарата Millipore).

**2.5.7. Содержание алкалоида в клетках.** 10 мг замороженно-высушенных клеток экстрагировались с помощью 2 мл смеси метанол-вода (5:5) ультразвуком при окружающей температуре в течение 15 минут. После центрифугирования (10 мин при 5400 оборотов в минуту) экстракты набирались в 10 мл объемную пробирку и заливались до конца объема экстракционным раствором. Все образцы перед применением профильтровались через 0.45 мкм нейлоновые мембранные фильтры (Sigma-Aldrich). В результате, 20 мкл вводилось в аппарат ВЭЖХ с использованием 100-С18, 5-м, 250-4 мм колонок. Методом, описанным Sheu et al. (2001), проводилось определение эфедрина и псевдоэфедрина.

**2.5.8. Данные анализа для суспензионной культуры.** Полученные окончательные данные 3-х образцов выражались средним значением  $\pm$  стандартное отклонение (СО), тогда как анализ проводился последовательным образом каждые два дня вплоть до 16-ого дня. Корреляции обработок определялись с помощью компьютерной программы SAS с последующим установлением относительной линейной зависимости относительно роста клеток в течение 16 дней.

**2.6. Подготовка экстрактов на предмет определения антимикробной, антиоксидантной активности, а также и на содержание общего фенола.** Надземные части этих трех видов *Ephedra* высушивались при комнатной температуре ( $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) в темном помещении, после чего столчены в порошок. Метанольные экстракты получались путем мацерации неочищенного порошка растения со смесью метанол-вода (90/10) и выдерживания в течение 2 дней в камере при температуре  $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$  в темноте. Каллус экстрагировался с метанолом в течение 48 часов. Полученные метанольные экстракты отбирались с каждой среды каллусной культуры, а растворитель выпаривался под вакуумом роторным испарителем (при температуре ниже  $40^{\circ}\text{C}$ ).

#### **2.6.1. Метод диск-диффузии для определения антимикробной активности.**

В каждом тесте микроорганизмы культивировались при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 16-24 часов и подготавливались к эквиваленту мутности согласно McFarland стандарту № 0.5. После чего суспензии засеивались на тестовые чашки (питательный агар). Стерильные диски импрегнировались 0.5; 1.0; 2.0 и 4.0 мг экстракта каллуса диких растений и устанавливались на поверхности тестовой чашки. Далее диски положительного контроля с гентамицином, ампициллином и кетокенозолом (10 мкг/диск) для грамотрицательных, грамположительных бактерий и грибов, соответственно, сравнивались и с каллусом, и с экстрактами растений. Тестируемыми микроорганизмами являлись: *Escherichia coli* (PTCC 1338), *Bacillus subtilis* (PTCC 1023), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Staphylococcus epidermis* (PTCC 1114), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074), *Aspergillus nigr*a (PTCC 5010), *Candida albicans* (PTCC 5027), *Klebsiella*

*pneumoniae* (PTCC 1031), *Salmonella typhi* (PTCC 1693), которые были получены из Persian Type Culture Collection (PTCC), Химического Научно-исследовательского Центра Медицинских и Натуральных Продуктов и Университета Медицинских Наук (Шираз, Иран).

**2.7. Определение антиоксидантной активности.** Определение антиоксидантной активности проводилось путем смешивания безводного ацетата Na (38 мМ) с дистиллированной водой с использованием FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) теста согласно методу, описанному Benzie и Strain (1996).

**2.8. Определение содержания общего фенола.** Тест Folin Ciocalteu (описанный Singleton-ом и Rossi (1965) в 3-х разовом выполнении проводилось для определения общих фенольных соединений.

**2.9. Статистический анализ и дизайн экспериментов для определения антимикробной, антиоксидантной активности и содержания общего фенола.**

Все эксперименты проводились в полностью рандомизированном дизайне. Полученные экспериментальные данные выражались средним значением [(средняя величина ± стандартная ошибка (n = 3)]. Определена корреляция вариантов (кв). Тесты повторялись трижды для точности и достоверности.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**3.1. Влияние фитогормонов на каллусную индукцию и клеточную биомассу *Ephedra strobilacea* Bunge, *Ephedra pachyclada* Boiss и *Ephedra procera* Fisch et C. A. Mey**

**3.1.1. *E. strobilacea*.** Данные, полученные относительно каллусной индукции *E. strobilacea* представлены в таблице 3.1.1.1 и 3.1.1.2. Согласно результатам, частота индукции значительно увеличивалась по мере повышения уровня НУК наряду с применяемым диапазоном цитокинов. При этом никакой каллусной индукции при уровне НУК (0.5 мг/л) наряду с любым применяемым диапазоном Кин не наблюдалось, тогда как минимальная каллусная индукция наблюдалась при применении 1.0 мг/л НУК в качестве ауксина в данном растении.

Применение БАП в качестве цитокина наряду с НУК в принятых гормональных концентрациях имело значительное влияние на каллусную индукцию и параметры роста каллуса, хотя полученные данные относительно параметров каллусного роста указывают на сравнительно больший эффект при обработках с применением Кин-ов.

Таблица 3.1.1.1. Влияние различных диапазонов НУК и Кин на время каллусной индукции, вес каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. strobilacea*

Обработка	Регуляторы роста растения		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации мг/экспланта	Конечный свежий вес (г/экспланта)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции (%)	Качество каллуса
	НУК	Кин						
1	0.5	0.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0.5	1.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	0.5	1.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	0.5	2.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1.0	0.5	18	9.55 ± 0.30	2.21 ± 0.11	0.07 ± 0.004	24	мутно-коричневый, компактный
6	1.0	1.0	18	9.69 ± 0.16	2.46 ± 0.15	0.08 ± 0.005	28	полутвердый, бледно-зеленый
7	1.0	1.5	18	14.25 ± 0.50	3.60 ± 0.03	0.12 ± 0.001	44	полутвердый, бледно-зеленый
8	1.0	2.0	16	8.43 ± 0.23	2.49 ± 0.12	0.08 ± 0.004	40	зеленый, губчатый, хрупкий
9	1.5	0.5	23	12.63 ± 0.25	3.21 ± 0.04	0.11 ± 0.001	42	полутвердый, бледно-зеленый
10	1.5	1.0	14	17.36 ± 0.53	3.92 ± 0.31	0.14 ± 0.020	62	зеленый, рыхлый, хрупкий
11	1.5	1.5	18	10.28 ± 0.38	2.70 ± 0.06	0.09 ± 0.002	44	полутвердый, бледно-зеленый
12	1.5	2.0	16	9.58 ± 0.32	2.44 ± 0.21	0.08 ± 0.001	44	зеленый, рыхлый, хрупкий
13	2.0	0.5	23	4.85 ± 0.45	1.19 ± 0.32	0.04 ± 0.001	28	бледный-коричневый, компактный
14	2.0	1.0	18	8.59 ± 0.32	2.44 ± 0.21	0.08 ± 0.007	42	зеленый, губчатый, хрупкий
15	2.0	1.5	23	7.46 ± 0.22	1.83 ± 0.03	0.06 ± 0.001	44	зеленый, губчатый, хрупкий
16	2.0	2.0	18	6.62 ± 0.22	1.72 ± 0.06	0.06 ± 0.002	36	полутвердый, бледно-зеленый

Данные представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 12). Полученные данные при обработке: НУК : 1,5, Кин 1,0 представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 25). Время каллусной инициации показывает примерное время, необходимое для каллусной индукции, и средняя частота индукции, выраженная в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов.

Таблица 3.1.1.2. Влияние различных соотношений НУК и БАП на время каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. strobilacea*

Обработка	Регуляторы роста растения (мг/л)		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации (мг/экспланта)	Конечный свежий вес (г/экспланта)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции (%)	Качество каллуса
	НУК	БАП						
1	0.5	0.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0.5	1.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	0.5	1.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	0.5	2.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1.0	0.5	23	5.54 ± 1.05	1.09 ± 0.07	0.04 ± 0.003	16	мутно-коричневый, компактный
6	1.0	1.0	18	5.82 ± 0.34	1.94 ± 0.04	0.06 ± 0.003	24	полутвердый, бледно-зеленый
7	1.0	1.5	16	9.19 ± 0.30	2.15 ± 0.11	0.07 ± 0.020	32	полутвердый, бледно-зеленый
8	1.0	2.0	16	7.68 ± 0.16	1.26 ± 0.15	0.04 ± 0.001	28	зеленый, губчатый, хрупкий
9	1.5	0.5	16	8.56 ± 0.25	2.11 ± 0.12	0.07 ± 0.005	40	полутвердый, бледно-зеленый
10	1.5	1.0	14	10.14 ± 0.46	2.60 ± 0.61	0.09 ± 0.001	44	зеленый, рыхлый, хрупкий
11	1.5	1.5	14	9.92 ± 0.36	2.57 ± 0.04	0.09 ± 0.004	40	полутвердый, бледно-зеленый
12	1.5	2.0	16	9.05 ± 0.53	2.55 ± 0.39	0.09 ± 0.002	40	зеленый, рыхлый, хрупкий
13	2.0	0.5	18	3.53 ± 0.29	1.03 ± 0.11	0.03 ± 0.003	28	бледно-коричневый, компактный
14	2.0	1.0	18	7.04 ± 0.22	2.58 ± 0.06	0.09 ± 0.003	36	зеленый, губчатый, хрупкий
15	2.0	1.5	18	4.58 ± 0.45	1.41 ± 0.32	0.05 ± 0.004	32	зеленый, губчатый, хрупкий
16	2.0	2.0	23	3.76 ± 0.32	0.81 ± 0.21	0.02 ± 0.002	28	мутно-коричневый, компактный

Данные представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 12). Время каллусной инициации показывает примерное время, необходимое для каллусной индукции, и средняя частота индукции, выраженная в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов.

**3.1.2. *E. pachyclada*.** Данные относительно *E. pachyclada* представлены в таблице 3.1.2.1 и 3.1.2.2. Наибольший вес каллусной инициации (весом  $17.42 \pm 0.39$  мг/эксплант) достигался при обработке гормональным соотношением НУК : 2.0; Кин : 0.5 (мг/л). Примерное время, необходимое для каллусной инициации, определялось на 16-ый день на фоне выбранного гормонального диапазона в MS стандартной среде. После 4-ой субкультуры (весом  $3.76 \pm 0.27$  г/эксплант) отмечалось для *E. pachyclada* каллусного свежего веса с определенной ОЧР в  $0.13 \pm 0.01$  г/г/день. Окончательные результаты указывают на то, что 44% эксплантов *E. pachyclada* индуцируют каллус при соотношении: НУК: 2.0; БАП: 1.0 (мг/л) в среде, а время каллусной индукции составляло 16 дней. Практически, согласно результатам, каллусная индукция в *E. strobilacea* была идентичной таковой в *E. pachyclada*, то есть она не наблюдалась при воздействии Кин или БАП, применяемых в качестве цитокинов в любых соотношениях при уровне НУК в 0.5 мг/л. Однако, она уже наблюдалась, когда уровень НУК повышался до 1.0 мг/л в среде, что приводило и к значительному повышению частоты индукции в наших опытах.



Таблица 3.1.2.1. Влияние различных соотношений НУК и Кин на время каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. pachyclada*

Обработка	Регуляторы роста растения (мг/л)		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации (мг/экспланта)	Конечный свежий вес (г/экспланта)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции	Качество каллуса
	НУК	Кин						
1	0.5	0.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0.5	1.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	0.5	1.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	0.5	2.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1.0	0.5	18	8.42 ± 0.50	1.91 ± 0.10	0.07 ± 0.004	36	полутвердый, бледно-зеленый
6	1.0	1.0	23	7.11 ± 0.31	1.71 ± 0.05	0.06 ± 0.002	32	полутвердый, бледно-зеленый
7	1.0	1.5	23	5.98 ± 0.58	1.56 ± 0.06	0.05 ± 0.002	28	бледно-коричневый, компактный
8	1.0	2.0	23	4.00 ± 0.37	1.22 ± 0.09	0.04 ± 0.003	28	бледно-коричневый, компактный
9	1.5	0.5	18	12.34 ± 0.37	2.63 ± 0.10	0.09 ± 0.005	40	полутвердый, бледно-зеленый
10	1.5	1.0	18	10.67 ± 0.70	2.34 ± 0.06	0.08 ± 0.002	40	полутвердый, бледно-зеленый
11	1.5	1.5	23	9.33 ± 0.35	1.90 ± 0.30	0.07 ± 0.010	23	бледно-коричневый компактный
12	1.5	2.0	23	8.45 ± 0.35	1.80 ± 0.05	0.06 ± 0.002	23	бледно-коричневый, компактный
13	2.0	0.5	16	17.42 ± 0.39	3.76 ± 0.27	0.13 ± 0.010	52	полутвердый, бледно-зеленый
14	2.0	1.0	18	16.20 ± 0.52	3.38 ± 0.11	0.12 ± 0.003	40	полутвердый, бледно-зеленый
15	2.0	1.5	23	12.01 ± 0.91	2.55 ± 0.12	0.09 ± 0.004	32	бледно-коричневый, компактный
16	2.0	2.0	23	7.75 ± 0.69	1.67 ± 0.90	0.06 ± 0.003	28	мутно-коричневый, компактный

Данные представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 12). Полученные данные при обработке: НУК : 2,0, Кин : 0,5 представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 25). Время каллусной инициации показывает среднее время, необходимое для каллусной индукции, и средняя частота индукции выражена в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов.

Таблица 3.1.2.2. Влияние различных соотношений НУК и БАП на время каллусной инициации, вес каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. pachyclada*

Обработка	Регуляторы роста растения (мг/л)		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации (мг/экспланта)	Конечный свежий вес (г/экспланта)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции (%)	Качество каллуса
	НУК	БАП						
1	0.5	0.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0.5	1.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	0.5	1.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	0.5	2.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1.0	0.5	23	5.72 ± 0.59	0.93 ± 0.14	0.033 ± 0.005	23	бледно-коричневый, компактный
6	1.0	1.0	23	6.40 ± 0.53	1.49 ± 0.08	0.053 ± 0.003	32	бледно-коричневый, компактный
7	1.0	1.5	23	7.55 ± 0.49	1.25 ± 0.07	0.044 ± 0.002	36	бледно-коричневый, компактный
8	1.0	2.0	23	5.06 ± 0.33	1.13 ± 0.14	0.036 ± 0.005	23	бледно-коричневый, компактный
9	1.5	0.5	23	6.40 ± 0.41	1.83 ± 0.15	0.095 ± 0.005	36	бледно-коричневый, компактный
10	1.5	1.0	16	9.62 ± 0.23	2.68 ± 0.16	0.089 ± 0.008	36	полутвердый, бледно-зеленый
11	1.5	1.5	18	7.85 ± 0.43	2.51 ± 0.22	0.072 ± 0.005	32	полутвердый, бледно-зеленый
12	1.5	2.0	18	7.50 ± 0.75	2.50 ± 0.16	0.070 ± 0.005	32	полутвердый, бледно-зеленый
13	2.0	0.5	18	7.49 ± 0.61	2.25 ± 0.19	0.080 ± 0.007	40	полутвердый, бледно-зеленый
14	2.0	1.0	16	12.52 ± 0.30	3.24 ± 0.20	0.110 ± 0.007	44	полутвердый, бледно-зеленый
15	2.0	1.5	18	10.03 ± 0.42	2.78 ± 0.22	0.099 ± 0.008	40	полутвердый, бледно-зеленый
16	2.0	2.0	23	8.33 ± 0.56	2.52 ± 0.17	0.089 ± 0.006	32	полутвердый, бледно-зеленый

Данные представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 12). Время каллусной инициации показывает среднее время, необходимое для каллусной инициации, и средняя частота индукции выражена в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов.

**3.1.3. *E. procera*.** На основе результатов мы заключили, что выбранный гормональный диапазон имеет значительное влияние на каллус в *E. procera*. А именно, частота каллусной индукции увеличивалась, а индукционное время укорачивалось значительным образом по мере увеличения НУК в качестве ауксина. Вероятно, имеется обратно-пропорциональная взаимосвязь между частотой индукции и временем индукции каллусной инициации с одной стороны и уровнем цитокинов с другой стороны. Следовательно, полученные данные указывают на то, что при обработке гормональным соотношением НУК : 2.0; Кин : 1.0 при  $19.3 \pm 0.8$  мг/эксплант начальный свежий вес каллуса определялся в  $6.65 \pm 0.26$  г (увеличение на 344%) после 112 дней с ОЧР, равной 0.23 г/г/день, что является наибольшим достижением среди других обработок. Количество свежего веса определялось в  $2.42 \pm 0.25$  г (ОЧР = 0.086 г/г/день) при НУК : 2.0 мг/л и БАП : 1.0 мг/л, а наибольшее количество конечного свежего веса - при применении БАП в качестве цитокина после 42 дней достигалось гормональным диапазоном НУК : 1.0; БАП : 1.5 мг/л. При этом количество свежего веса в  $2.628 \pm 0.2$  г (повышение на 243%) определялось с ОЧР в  $0.093 \pm 0.007$  г/г/день и начальным весом в  $10.8 \pm 0.7$  мг/эксплант.

Таблица 3.1.3.1. Влияние различных соотношений НУК и Кин на время каллусной инициации, вес каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. procera*

Обработка	Регуляторы роста растения (мг/л)		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации (мг/эксплант)	Конечный свежий вес (г/эксплант)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции (%)	качество каллуса
	НУК	Кин						
1	0.5	0.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	0.5	1.0	20	$3.8 \pm 0.26$	Нз	-----	12	бледно-зеленый, компактный
3	0.5	1.5	18	$6.3 \pm 0.48$	Нв	-----	16	твердый, бледно-зеленый, тусклый
4	0.5	2.0	20	$9.9 \pm 0.70$	Нв	-----	24	твердый, бледно-зеленый, тусклый
5	1.0	0.5	18	$3.8 \pm 0.26$	Нз	Нз	16	мрачно-коричневый, компактный
6	1.0	1.0	18	$12.4 \pm 0.60$	$2.48 \pm 0.27$	$0.08 \pm 0.009$	44	полутвердый, бледно-зеленый, тусклый
7	1.0	1.5	14	$18.6 \pm 0.40$	$4.49 \pm 0.20$	$0.16 \pm 0.007$	44	полутвердый, бледно-зеленый
8	1.0	2.0	16	$14.9 \pm 0.90$	$2.07 \pm 0.20$	$0.07 \pm 0.010$	56	зеленый, губчатый, хрупкий
9	1.5	0.5	23	$4.0 \pm 0.28$	Нз	Нз	28	коричневый, компактный
10	1.5	1.0	16	$17.4 \pm 0.40$	$3.77 \pm 0.27$	$0.13 \pm 0.009$	52	зеленый, губчатый хрупкий
11	1.5	1.5	16	$16.7 \pm 1.10$	$4.25 \pm 0.60$	$0.15 \pm 0.020$	52	зеленый, рыхлый, губчатый, хрупкий
12	1.5	2.0	14	$16.8 \pm 0.50$	$3.10 \pm 0.20$	$0.11 \pm 0.007$	52	зеленый, рыхлый, полутвердый
13	2.0	0.5	19	$4.2 \pm 0.21$	$2.67 \pm 0.19$	$0.09 \pm 0.006$	28	бледно-коричневый, компактный
14	2.0	1.0	12	$19.3 \pm 0.80$	$6.65 \pm 0.26$	$0.23 \pm 0.009$	68	зеленый, рыхлый, хрупкий
15	2.0	1.5	16	$19.7 \pm 0.90$	$5.49 \pm 0.30$	$0.19 \pm 0.010$	52	зеленый, рыхлый, хрупкий
16	2.0	2.0	18	$21.4 \pm 0.01$	$4.27 \pm 0.11$	$0.15 \pm 0.004$	44	зеленый, губчатый, полутвердый

Примечание: Данные представлены в средних значениях  $\pm$  стандартное отклонение (n = 12). Время каллусной инициации показывает примерное время, необходимое для каллусной инициации, и средняя частота индукции выражена в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов; Нз: в связи с бесплодным каллусом данные не записано; Нв: каллус не выжил в среде.

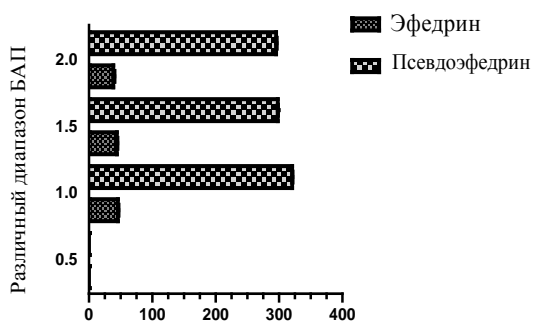
Таблица 3.1.3.2. Влияние различных диапазонов НУК и БАП на время каллусной инициации, вес каллусной инициации, конечный свежий вес, ОЧР, среднюю частоту индукции и качество каллуса *E. prosera*

Обработка	Регуляторы роста растения (мг/л)		Время инициации каллуса (дни)	Вес каллусной инициации (мг/экспланта)	Конечный свежий вес (г/экспланта)	ОЧР (г/г/день)	Средняя частота индукции (%)	Качество каллуса
	НУК	БАП						
1	0.5	0.5	-----	----	----	----	-----	-----
2	0.5	1.0	-----	----	----	----	-----	-----
3	0.5	1.5	24	2.2 ± 0.21	Нв	-----	8	бледно-коричневый, компактный
4	0.5	2.0	-----	----	----	----	-----	-----
5	1.0	0.5	20	1.4 ± 0.20	Нз	Нз	12	полутвердый, бледно-зеленый, мутный
6	1.0	1.0	20	7.6 ± 0.34	0.97 ± 0.13	0.034 ± 0.004	16	полутвердый, бледно-зеленый, мутный
7	1.0	1.5	18	10.8 ± 0.70	2.628 ± 0.20	0.093 ± 0.007	28	полутвердый, бледно-зеленый
8	1.0	2.0	18	8.8 ± 0.50	0.71 ± 0.05	0.025 ± 0.002	28	полутвердый, бледно-зеленый
9	1.5	0.5	20	2.2 ± 0.17	Нз	Нз	8	коричневый, компактный
10	1.5	1.0	18	9.4 ± 0.14	1.52 ± 0.16	0.054 ± 0.005	44	зеленый, рыхлый, хрупкий
11	1.5	1.5	16	13.3 ± 0.60	2.19 ± 0.10	0.078 ± 0.006	52	зеленый, рыхлый, губчатый
12	1.5	2.0	18	12.1 ± 0.40	1.60 ± 0.15	0.057 ± 0.005	44	зеленый, губчатый, полутвердый
13	2.0	0.5	18	2.5 ± 0.28	1.97 ± 0.20	0.070 ± 0.007	52	бледно-коричневый, компактный
14	2.0	1.0	16	11.4 ± 0.60	2.42 ± 0.25	0.086 ± 0.009	52	зеленый, рыхлый, хрупкий
15	2.0	1.5	16	13.9 ± 0.50	1.43 ± 0.20	0.051 ± 0.008	52	зеленый, рыхлый хрупкий
16	2.0	2.0	18	14.5 ± 0.40	1.77 ± 0.15	0.063 ± 0.005	44	зеленый, гучатый, полутвердый

Примечание: Данные представлены в средних значениях ± стандартное отклонение (n = 12). Время каллусной инициации показывает примерное время, необходимое для каллусной инициации, и средняя частота индукции выражена в процентах от индуцированного каллуса 25-и эксплантов; Нз: в связи с бесплодным каллусом данные не записано; Нв: каллус не выжил в среде.

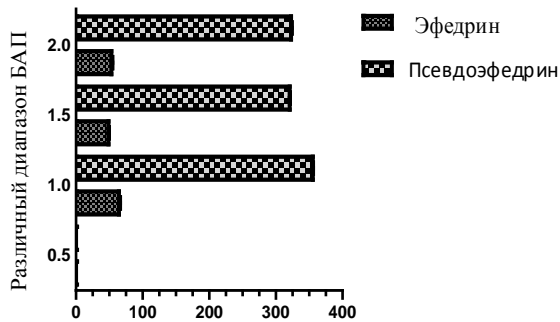
**3.2. Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина в *E. prosera*.** Полученные результаты показали, что минимальные количества эфедрина и псевдоэфедрина синтезировались при использовании БАП в качестве цитокина с дозировкой гормонов: НУК –2.0 и БАП – 0.5 мг/л, и количеств сухого веса:  $37.4 \pm 0.1$  мкг/г и  $274.2 \pm 1.9$  мкг/г для эфедрина и псевдоэфедрина, соответственно (рис. 3.2.3). Фактически, в наших анализах не было выявлено никаких концентраций ни эфедрина, ни псевдоэфедрина при использовании следующего гормонального диапазона: НУК – 1.0, БАП – 0.5 мг/л. Между тем, максимальные количества эфедрина и псевдоэфедрина определялись в случае НУК – 2.0, БАП – 1.0 мг/л обработки. При этом количества сухого веса в  $83.9 \pm 1.3$  мкг/г и  $466.2 \pm 0.5$  мкг/г были определены для эфедрина и псевдоэфедрина, соответственно (рис. 3.2.2).

Полученные нами данные указывают на значимые результаты относительно концентраций эфедрина и псевдоэфедрина в *E. prosera* каллусе при воздействии НУК дозой в 1.5 мг/л вместе с БАП. Тогда как, их наибольшие количества определялись при БАП: 1,0 мг/л,  $64.5 \pm 1.5$  мкг/г и  $355.4 \pm 0.3$  мкг/г сухого веса для эфедрина и псевдоэфедрина, соответственно (рис. 3.2.3.). В итоге, максимальные количества эфедрина и псевдоэфедрина, среди всех вариантов обработки, определялись при НУК – 2.0 и Кин – 1.0 мг/л и количеств сухого веса в  $108.1 \pm 0.006$  мкг/г и  $730.3 \pm 1$  мкг/г для эфедрина и псевдоэфедрина, соответственно (рис. 3.2.6 и 3.2.7). Очевидно, что большинство вариантов обработок продукции эфедрина начиналась с малой интенсивностью, с последующим достижением своих максимальных значений, а после заканчивалась резким понижением выработки и достигала минимальных концентраций, когда соотношение цитокины/ауксин удваивалось более чем в половину. С другой стороны, минимальная продукция эфедрина наблюдалась при применении НУК – 1.5, Кин – 0.5 мг/л и количества сухого веса в  $319.9 \pm 0.5$  мкг/г, хотя и как оказалось, особенных различий между НУК – 1.5, Кин: 0.5 и НУК: 1.0, Кин: 2.0 не наблюдалось.



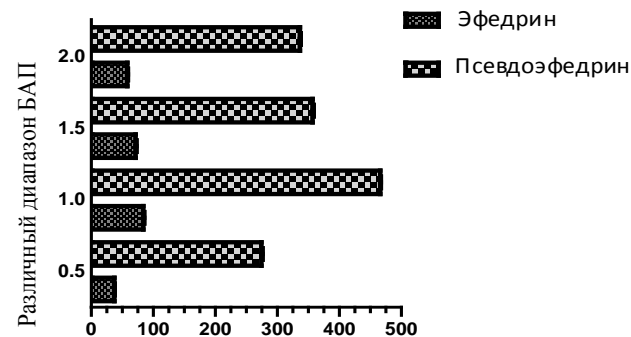
Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.1 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 1.0 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]



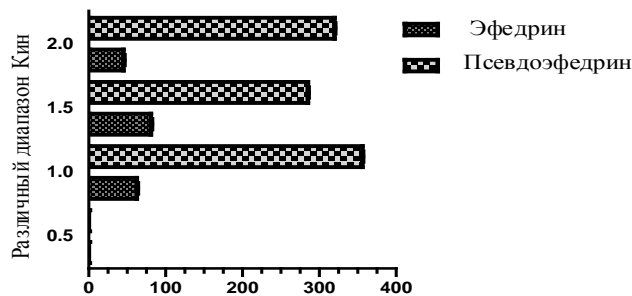
Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.2 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 1.5 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]



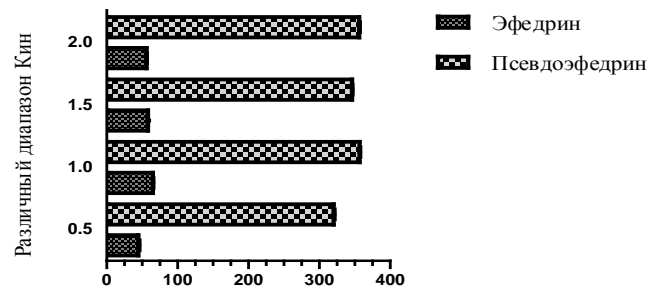
Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.3 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 2.0 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]



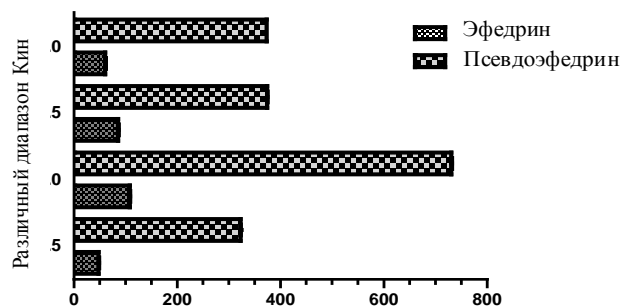
Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.4 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 1.0 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]



Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.5 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 1.5 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]



Содержание эфедрина и псевдоэфедрина

Рис. 3.2.6 Эффект фитогормонов на содержание эфедрина и псевдоэфедрина при НУК в 2.0 мг/л [среднее значение±стандартная ошибка (n=4)]

### 3.3. Накопление хлорофилла и алкалоидов в дифференцированных клетках *E. procera*

На фоне постоянного мониторингования обработок в течение всего периода проведения тестов был замечен случайный ризогенез в 5-ой субкультуре в 18% обработок с НУК : 2.0, Кин : 1.0 (мг/л), причем корни длиной в  $1 \pm 0.5$  см определялись через 28 дней. Анализировались продуцированные корни на содержание эфедрина и псевдоэфедрина. Хотя нам не удалось определить их накопление в каком-либо количестве, тем не менее, похоже, что оно значительно повышалось в корневом каллусе по сравнению с недифференцированными клетками в случае того же самого гормонального диапазона. В этой связи,  $173.891 \pm 5.31$  мкг/г и  $722.46 \pm 1.96$  мкг/г сухого веса были определены, соответственно, для накопления эфедрина и псевдоэфедрина в корневых обработках, тогда как в неспециализированных образцах в 5-ой субкультуре определенные для эфедрина и псевдоэфедрина количества составляли соответственно  $90.8 \pm 21.8$  и  $350 \pm 38.5$  мкг/г (Таблица 3.3.1.).

Таблица 3.3.1. Влияние различного гормонального диапазона в MS стандартной среде на биомассу клеток, содержание хлорофилла, эфедрина и псевдоэфедрина в *E. procera*.

Обработки	Хлорофилл а (мкг/мг сухого веса)	Хлорофилл b (мкг/мг сухого веса)	Общий хлорофилл (мкг/мг сухого веса)	Эфедрин (мкг/г сухого веса)	Псевдо- эфедрин (мкг/г сухого веса)
НУК:2.0, Кин:1.0 (4-ая субкультура)	$93.00 \pm 2.5$	$25.43 \pm 5.1$	$118.4 \pm 7.60$	$108.1 \pm 0.6$	$730.30 \pm 1.00$
НУК:2.0, Кин:1.0 (5-ая субкультура)	$84.65 \pm 3.6$	$31.79 \pm 6.11$	$116.42 \pm 2.95$	$90.8 \pm 21.8$	$350.00 \pm 38.50$
НУК:2.0, Кин:1.0 Ризогенез при обработках	$93.36 \pm 2.3$	$32.63 \pm 3.20$	$120.0 \pm 7.45$	$173.89 \pm 5.31$	$772.46 \pm 1.96$

Примечание: Данные представлены в средних значениях  $\pm$  стандартное отклонение (n = 4)

**3.4. Суспензионная культура в *E. procera*.** Полученные результаты показывают, что в суспензионной культуре *E. procera* клеточные линии в контрольной обработке проходят лаг-фазу на 6-ой день культивирования и плавно переходят в экспоненциальную фазу между 6-ым и 10-ым днями, однако постепенно уменьшаются начиная с 12-ого дня и переходят в стационарную фазу (рис. 3.4.1.). При этом,

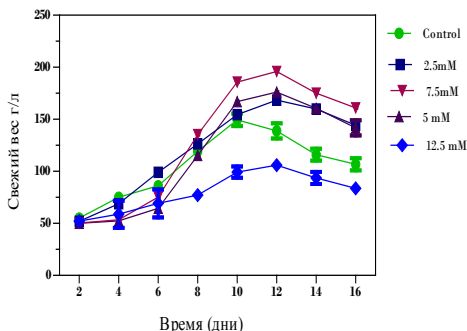


Рис. 3.4.1 Сравнительная характеристика свежего веса в течение 16 дней при различных уровнях L-фенилаланина.

[Данные представлены в среднем от 3-х образцов ± стандартная отклонение (СО)]

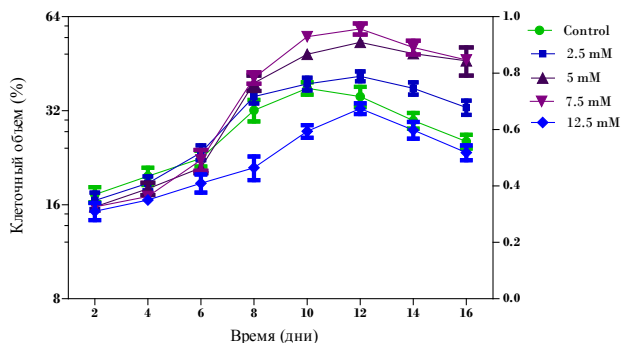


Рис. 3.4.2 Сравнительная характеристика клеточного объема (КО) в течение 16 дней при различных уровнях L-фенилаланина.

[Данные представлены в среднем от 3-х образцов ± стандартная отклонение (СО)]

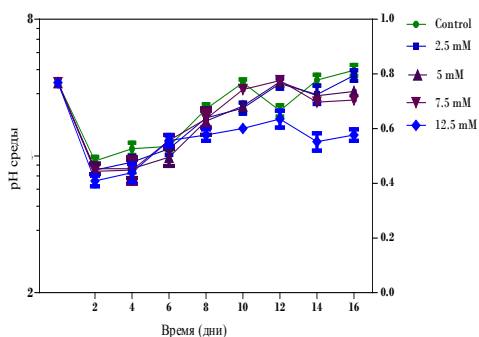


Рис. 3.4.3 Сравнительная характеристика pH среды в течение 16 дней при применении диапазона L-фенилаланина.

[Данные представлены в среднем значении 3-х образцов ± стандартная отклонение (СО)]

уменьшение жизнеспособности. В итоге, жизнеспособность клеток достигала своего наименьшего уровня (уменьшение на  $69 \pm 2.58\%$ ) на 16-ый день. (Таблица 3.4.1.).

К тому же, результаты анализов указывают на то, что наибольшие количества эфедрина и псевдоэфедрина определялись при 7.5 mM L-фенилаланина на 12-ый день ( $112.77 \pm 0.54$  мкг/г сухой вес и  $588.68 \pm 1.84$  мкг/г сухой вес, для эфедрина и псевдоэфедрина соответственно).



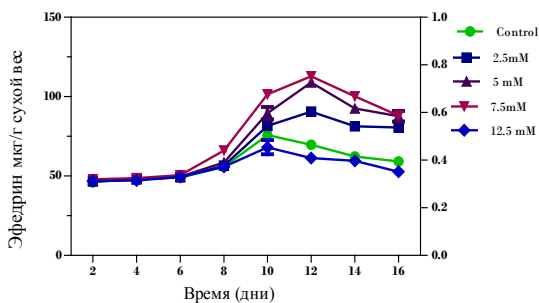


Рис.3.4.4 Содержание эфедрина в течение 16 дней при различных уровнях L-фенилаланина. [Данные представлены в среднем от 3-х образцов ± стандартная отклонение (CO)]

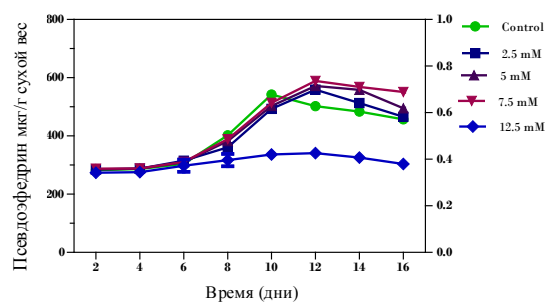


Рис.3.4.5 Содержание псевдоэфедрина в течение 16 дней при различных уровнях L-фенилаланина. [Данные представлены в среднем от 3-х образцов ± стандартная отклонение (CO)]

**Таблица 3.4.1. Сравнительный анализ жизнеспособности клеток в среде в течение 16 дней в применяемом диапазоне L-фенилаланина и в контроле (%)**

Дни	Контроль (мМ)	2.5 (мМ)	5.0 (мМ)	7.5 (мМ)	12.5 (мМ)
2	74.5 ± 3.41	76.2 ± 2.90	74.5 ± 2.08	76.5 ± 1.29	53.2 ± 2.21
4	85.5 ± 30	83.0 ± 2.58	80.2 ± 2.21	80.5 ± 2.08	57.2 ± 2.5
6	90.7 ± 2.98	83.0 ± 2.16	81.2 ± 2.5	82.2 ± 1.7	61.2 ± 2.5
8	91.0 ± 2.58	85.5 ± 2.64	87.5 ± 2.08	87.2 ± 2.21	63.5 ± 1.82
10	95.2 ± 1.70	92.2 ± 1.25	90.7 ± 2.21	92.0 ± 1.63	66.0 ± 1.82
12	92.7 ± 2.21	94.5 ± 0.57	96.0 ± 0.81	96.0 ± 1.41	68.5 ± 1.29
14	82.5 ± 2.64	90.5 ± 1.29	93.0 ± 2.58	93.5 ± 1.29	60.0 ± 1.63
16	69.0 ± 2.58	80.2 ± 1.70	82.7 ± 2.21	82.5 ± 3.10	44.2 ± 1.70

Данные представлены средним значением 3-х образцов ± стандартное отклонение (CO).

**3.5. Антимикробная активность.** Сравнительный анализ результатов при обработках для определения антимикробной активности представлены в таблице 3.5.1., где показана значительная антимикробная активность всех трех указанных видов *Ephedra*, причем по мере увеличения количества экстрактов (мг/диск) зоны ингибиции расширялись и становились хорошо обозримыми. Согласно тесту диск-диффузии метанольные экстракты диких растений проявляли антимикробную активность против выбранных микроорганизмов на всех применяемых уровнях, и их антимикробная активность значительно повышалась при их количестве в 4 мг/мл. Согласно результатам анализов экстрактов всех отмеченных видов (кallус или растение) вид *E. strobilacea* проявлял наибольшую антимикробную активность против *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1114), с зоной ингибиции в  $15.3 \pm 1.15$  мм и индексом активности в  $0.73 \pm 0.5$ . В то же время, не было значительной разницы между видами *Ephedra* (в кallусных экстрактах) против *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1114): все виды *Ephedra* имели зону ингибации в  $10 \pm 1$  мм. Было выявлено также, что экстракты *Ephedra* оказывали влияние на рост *Escherichia Coli* (PTCC 1338), причем *Ephedra strobilacea* Bunge имела наибольшую зону ингибации в  $15.6 \pm 0.5$  мм с индексом активности в  $0.71 \pm 0.002$  (Таблица 3.5.1.).

Таблица 3.5.1. Антимикробная активность эскетрактв дикого растения и каллусной культуры трех видов *Ephedra*, мг/мл

Тип микроорганизмов		<i>E. procera</i>				<i>E. pachyclada</i>				<i>E. strobilacea</i>				Контроль
		0.5	1	2	4	0.5	1	2	4	0.5	1	2	4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (PTCC 1114)	ЗИРЭ	8.3 ±1.5	9 ±1.7	11.6 ±0.5	13.3 ±1.1	7.33 ±1.5	10.6 ±1.5	12 ±1	14 ±1	8.3 ±0.5	9.3 ±1.2	12.3 ±0.5	15.3 ±1.15	21 ±3
	ИАРЭ	0.41 ±0.07	0.45 ±0.08	0.58 ±0.02	0.66 ±0.5	0.38 ±0.08	0.56 ±0.08	0.63 ±0.5	0.73 ±0.05	0.39 ±0.02	0.44 ±0.05	0.58 ±0.02	0.73 ±0.05	
	ЗИКЭ	-	-	8.6 ±0.5	10 ±1	-	-	8.6 ±0.5	10 ±0.5	-	-	8.6 ±0.5	10 ±1	24 ±2
	ИАКЭ	-	-	0.43 ±0.02	0.45 ±0.1	-	-	0.48 ±0.03	0.55 ±0.05	-	-	0.4 ±0.04	0.58 ±0.02	
<i>Escherichia coli</i> (PTCC 1338)	ЗИРЭ	7.3 ±1.5	9.6 ±1.1	12 ±1.7	14 ±2	9.3 ±1.1	10.3 ±0.5	11.6 ±0.5	13 ±1	7.3 ±1.5	8.6 ±1.5	14 ±1	15.6 ±0.5	22 ±3
	ИАРЭ	0.32 ±0.06	0.43 ±0.05	0.54 ±0.07	0.63 ±0.09	0.46 ±0.05	0.51 ±0.02	0.58 ±0.02	0.65 ±0.05	0.33 ±0.06	0.39 ±0.02	0.63 ±0.04	0.71 ±0.02	
	ЗИКЭ	-	-	-	-	-	-	9 ±1.5	11.6 ±1.2	-	-	9 ±1	11.6 ±0.5	22 ±2
	ИАКЭ	-	-	-	-	-	-	0.36 ±0.07	0.53 ±0.02	-	-	0.4 ±0.02	0.52 ±0.06	
<i>Salmonella typhi</i> (PTCC 1693)	ЗИРЭ	6.6 ±0.5	8 ±1	11 ±1	13.3 ±1.1	9.3 ±1.5	10.6 ±1.15	11 ±1	12.3 ±1.5	7.6 ±1.15	10 ±1	13.6 ±1.5	15.3 ±1.15	22 ±1
	ИАРЭ	0.33 ±0.02	0.4 ±0.05	0.55 ±0.05	0.66 ±0.05	0.42 ±0.06	0.48 ±0.05	0.5 ±0.04	0.56 ±0.06	0.34 ±0.05	0.45 ±0.06	0.62 ±0.06	0.69 ±0.05	
	ЗИКЭ	-	-	7.3 ±0.5	8.6 ±0.5	-	-	7.3 ±0.5	8.6 ±1.2	-	-	7.3 ±0.5	8.3 ±0.5	21 ±3
	ИАКЭ	-	-	0.46 ±0.07	0.56 ±0.07	-	-	0.34 ±0.02	0.37 ±0.02	-	-	0.32 ±0.02	0.38 ±0.04	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PTCC 1074)	ЗИРЭ	10 ±1	12.6 ±1.1	15.3 ±0.5	17.3 ±1.1	12.6 ±1.1	14.3 ±1.15	15.6 ±1.5	17.3 ±1.15	10.3 ±1.52	11.3 ±1.15	15.3 ±0.5	18 ±1.15	24 ±2
	ИАРЭ	0.41 ±0.04	0.52 ±0.04	0.63 ±0.02	0.72 ±0.04	0.6 ±0.05	0.68 ±0.05	0.72 ±0.02	0.74 ±0.07	0.43 ±0.06	0.47 ±0.02	0.63 ±0.02	0.82 ±0.05	
	ЗИРЭ	9 ±1.5	10.6 ±1.5	12.3 ±0.5	13.3 ±1.52	7.6 ±0.5	10.6 ±1.1	12.3 ±0.5	13.6 ±1.5	9 ±1	10.61 ±0.5	12.3 ±0.5	13.6 ±1.5	22 ±4
	ИАРЭ	0.38 ±0.06	0.44 ±0.06	0.52 ±0.04	0.59 ±0.02	0.36±0.02	0.53 ±0.07	0.56 ±0.06	0.64 ±0.07	0.35 ±0.02	0.41 ±0.03	0.51 ±0.02	0.59 ±0.02	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (PTCC 1031)	ЗИРЭ	7.6 ±1.1	9 ±1	11 ±2	13.3 ±1.1	6.3 ±0.5	9.3 ±0.5	10.3 ±1.1	14 ±0.5	7.3 ±1.5	8 ±1.2	10.3 ±1.1	12.3 ±1.5	23 ±2
	ИАРЭ	0.31 ±0.04	0.37 ±0.04	0.45 ±0.08	0.55 ±0.04	0.35 ±0.03	0.51 ±0.03	0.57 ±0.06	0.77 ±0.03	0.3 ±0.02	0.33 ±0.02	0.43 ±0.04	0.51 ±0.06	
	ЗИРЭ	-	-	-	-	-	8.3	9	12.3	-	-	8.3	11	24



	ИАРЭ						±1.5	±1	±0.5			±1	±1	±2
		-	-	-	-	-	0.36 ±0.02	0.44 ±0.03	0.55 ±0.05	-	-	0.34 ±0.02	0.45 ±0.04	
Грамположительные бактерии		0.5	1	2	4	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4	
<i>Bacillus subtilis</i> (PTCC 1023)	ЗИРЭ	-	8.3 ±2.5	10 ±1.7	12 ±2	8.6 ±1.1	10 ±1	13 ±1	16 ±2	8.6 ±2	9.6 ±1	12 ±0.5	12.3 ±0.5	24 ±1
	ИАРЭ	-	0.34 ±0.1	0.41 ±0.07	0.5± 0.08	0.37 ±0.05	0.43 ±0.04	0.56 ±0.04	0.69 ±0.061	0.37 ±0.09	0.42 ±0.06	0.52 ±0.5	0.53 ±0.06	
	ЗИКЭ	-	-	-	10.6 ±1.52	-	-	8 ±2.6	10.6 ±1	-	-	10.3 ±0.5	10.6 ±1.5	23 ±2
	ИАКЭ	-	-	-	0.38 ±0.06	-	-	0.41 ±0.02	0.43 ±0.04	-	-	0.32 ±0.04	0.46 ±0.02	
<i>Staphylococcus aureus</i> (PTCC 1112)	ЗИРЭ	-	11.3 ±1.1	14.6 ±1.1	16.3 ±1.5	8.6 ±2	12.6 ±1.5	14.6 ±1.1	16 ±2	9.6 ±1	10.3 ±0.57	14.3 ±0.5	17.3 ±1.1	24 ±1
	ИАРЭ	-	0.45± 0.04	0.58 ±0.06	0.65 ±0.06	0.36 ±0.08	0.52 ±0.06	0.61 ±0.04	0.66 ±0.08	0.38 ±0.04	0.41 ±0.03	0.57 ±0.02	0.69 ±0.04	
	ЗИКЭ	-	8.6 ±1	10.3 ±0.5	11.6 ±0.5	-	8.6 ±1.5	10.3 ±0.5	11.6 ±1	-	8.6 ±0.5	10.3 ±0.5	11.6 ±0.5	22 ±2
	ИАКЭ	-	0.36 ± 0.04	0.38 ±0.02	0.45 ±0.02	-	0.38 ±0.02	0.44 ±0.05	0.46 ±0.02	-	0.37 ±0.04	0.41 ±0.02	0.46 ±0.06	

Примечание: Средняя величина  $n = 3 \pm$  стандартная ошибка. ЗИРЭ: зона ингибации экстракта растения *Ephedra* (мм), включая диаметр диска (6 мм); ИАРЭ: индекс активности экстракта растения *Ephedra* = площадь ингибации тестового образца/площадь ингибации стандарта; ЗИКЭ: зона ингибации каллуса *Ephedra* (мм), включая диаметр диска (6 мм); ИАКЭ: индекс активности экстракта каллуса *Ephedra* = площадь ингибации тестового образца/площадь ингибации стандарта; Но: не определено; контроль - это стандарт в 10 мкг/диск, в котором гентамицин используется для грамотрицательных бактерий, ампициллин - для грамположительных бактерий, и кетоназол - для грибов.

**3.6. Тест понижающий антиоксидантную активность (FRAP).** Тесты на антиоксидантную активность базировались на FRAP. Результаты тестов представлены на 3.6.1 и 3.6.2. и указывают на антиоксидантную активность всех 3-х выбранных видов *Ephedra* и дикого растения, и каллуса, хотя каллус проявил меньшую активность по сравнению с дикими растениями. Более того, метанольный экстракт *E. strobilacea* проявил наибольшую антиоксидантную активность среди всех видов *Ephedra* в трех отдельно проведенных факториальных тестах с хорошим коэффициентом вариации (кв = 10.2) при количестве дикого растения в  $1.61 \pm 0.08$  ммоль экв кверцетин/г экстракта и каллуса в  $0.278 \pm 0.02$  ммоль экв кверцетин/г экстракта в 3-х повторных тестах. Во 2-ом тесте, где в качестве контроля использовался  $\text{FeSO}_4$ , метанольный экстракт *E. strobilacea* также проявлял наибольшую антиоксидантную активность при количестве дикого

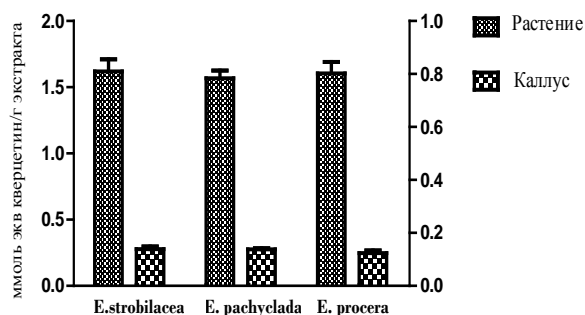


Рис.3.6.1 Сравнительная характеристика антиоксидантной активности дикого растения и каллусной культуры всех 3-х видов *Ephedra* на основании FRAP теста. (Все данные выражены в ммоль экв кверцетин/г экстракта) [среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=3)].

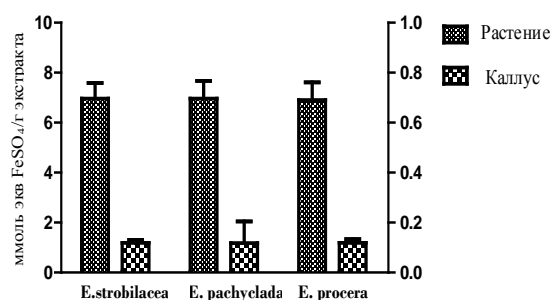


Рис. 3.6.2 Сравнительная характеристика антиоксидантной активности дикого растения и каллусной культуры всех 3-х видов *Ephedra* на основании FRAP теста. (Все данные выражены в ммоль экв  $\text{FeSO}_4$ /г экстракта) [среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=3)].

растения в  $6.96 \pm 0.63$  ммоль экв  $\text{FeSO}_4$ /г экстракта и каллусной культуры в  $1.19 \pm 0.11$  ммоль экв  $\text{FeSO}_4$ /г экстракта. Очевидно, что результаты с  $\text{FeSO}_4$  в качестве контроля могут являться дополнительным подтверждением антиоксидантной активности экстрактов. Антиоксиданты, в широком смысле этого слова, определяются как молекулы, которые будучи в низких концентрациях оказывают значительное замедление или же полностью приостанавливают

процесс оксидации окисляемых субстратов. Антиоксидантный потенциал экстракта *Ephedra*, по-видимому, связан с его водород-отдающей и металл-хелатирующей способностью, ровно как и с его эффективностью удалять пероксид водорода и свободные радикалы. Имеется достаточно исследований, демонстрирующих радикал-связывающие свойства фенольных соединений растения и подтверждающих их взаимосвязь с антиоксидантной активностью (Huang *et al*, 2005).

**3.7. Содержание фенола.** Результаты по определению фенольного содержания представлены на рисунке 3.7.1. Согласно результатам данного теста и дикое растение, и каллус содержали фенолы, а среди всех 3-х видов *Ephedra* дикое растение *E. strobilacea* имело наибольшее содержание при его

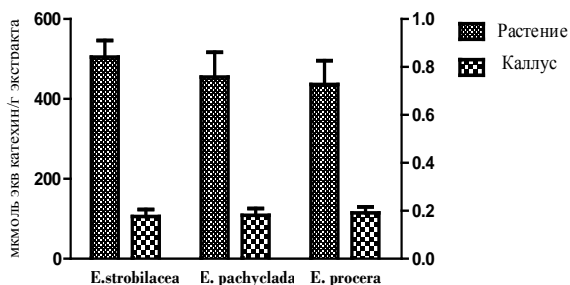


Рис. 3.7.1 Сравнительная характеристика содержания общего фенола в диком растении и каллусной культуре всех 3-х видов *Ephedra* на основе Folin Ciocalteu метода. Все данные представлены в средних значениях [среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=3)].

количестве в  $504.9 \pm 41.51$  ммоль экв катехин/г экстракта (кв :13.0), а его каллус также проявлял наибольший результат при количестве в  $114.61 \pm 15.13$  ммоль экв катехин/г экстракта (кв:13.2). Фенольные соединения найдены во всех растениях, однако вид соединений различается в разных его типах. Фенольные соединения не являются характерным для бактерий, грибов и водорослей, а определяемые фенолы представлены либо флавоноидами, либо же вообще отсутствуют.

**3.8. Содержание эфедрина и псевдоэфедрина в материнских растениях.** Результаты исследований относительно содержания эфедрина и псевдоэфедрина во всех 3-х видах *Ephedra* представлены на рисунке 3.8.1. Согласно полученным данным все выбранные 3 вида показали наличие эфедрина и псевдоэфедрина, причем их количества варьировали в разных видах: количество псевдоэфедрина определялось наибольшим в *E. strobilacea* ( $2670.68 \pm 10.15$  мкг/г сухого веса); содержание эфедрина и псевдоэфедрина в *E. pachyclada* примерно было одинаковым.

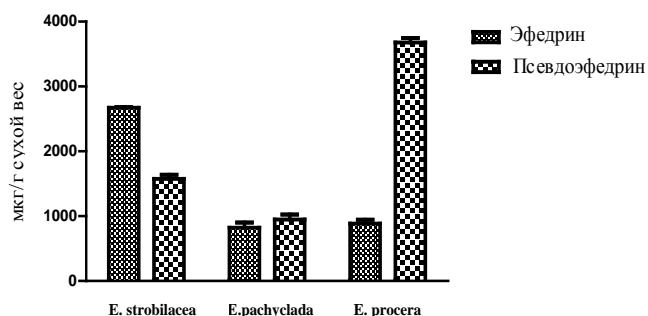


Рис. 3.8.1 Сравнительная характеристика содержания эфедрина и псевдоэфедрина во всех видов *Ephedra* все данные представлены в мкг/г сухого веса. [среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=3)].

Поскольку, в диких условиях растения подвергаются различного рода стрессам, следовательно количество вторичных метаболитов в значительной мере предопределяется этими условиями. Таким образом, уровень экспрессии вторичных метаболитов обуславливается степенью зрелости клеток и уровнем экспрессии гена в них.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований четко указывают на тот факт, что среди 3-х выбранных видов *Ephedra*, *E. procera* проявлял наибольшую частоту каллусной индукции или каллусного роста в выбранном для него гормональном диапазоне (оптимальный диапазон) в MS стандартной среде, а среди Кин и БАП, Кин был наиболее эффективным. Результаты также показали, что ни один эксплант не выживал в среде при содержании в ней НУК в концентрации 0,5 мг/л, и при этом ни Кин и ни БАП как цитокины не проявляли приоритетности. Согласно результатам, имеются значимые корреляции между повышением количества ауксина в среде и накоплением хлорофилла в *E. procera*. То есть по мере повышения уровня ауксина, количество общего хлорофилла значительно увеличивалось. Однако, наблюдалась обратно-пропорциональная взаимосвязь между диапазоном цитокинов и степенью накопления хлорофилла: количество хлорофилла уменьшалось с увеличением соотношения цитокин/ауксин. Более того, полученные нами данные показали, что с повышением количества цитокинов соотношение хлорофилл а/ хлорофилл b понижалось заметно, однако указанная обратно-пропорциональная зависимость становилась очевидной, когда количества цитокинов превышали количество ауксина в применяемом диапазоне при применении Кин в качестве цитокина наряду с НУК. К тому же количества хлорофилла были наибольшими с обработками с БАП. Практически гиперэкспрессия хлорофилла модулируется антисенесцентным эффектом цитокинов, синтезом 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), являющейся необходимым соединением в биосинтезе целлюлозы и в степени ее накопления при различных обработках.

Результаты наших исследований показали, что выбранный гормональный диапазон имел значительное влияние на синтезирование эфедрина и псевдоэфедрина в *E. procera*: во всех обработках их накопление начиналось постепенно с низкой крутизной, далее доходило до своего максимального уровня, а в конце резко уменьшалось до минимального содержания, что имело место на фоне повышения соотношения цитокины/ауксин в более чем  $\frac{1}{2}$  раза. К примеру, при уровне НУК : 2.0 мг/л на фоне применяемого Кин эфедрин синтезировался в минимальных количествах при Кин : 0.5 мг/л и сухом весе в  $47.4 \pm 0.9$  мкг/г, а максимальное его количество при Кин : 1.0 мг/л и сухом весе  $108.1 \pm 0.6$  мкг/г. Вместе с тем количества эфедрина и псевдоэфедрина увеличивались в каллусе по мере повышения специализации клеток *E. procera*. Меу, что подтверждает гипотезу применения фитогормонов для продуцирования ценных вторичных метаболитов. Полученные данные относительно суспензионной культуры *E. procera* показали, что клеточные линии в контроле проходили лаг-фазу на 6-ой день, и постепенно переходили в экспоненциальную фазу с 6-ого по 10-ый дни, однако с последующим постепенным понижением к 12-ому дню и переходом в стационарную фазу. А при применении L-фенилаланина рост клеточных линий повышался значительно в диапазоне 2.5; 5.0 и 7.5 (мМ) на 12-й день, но наименьший уровень роста отмечался при 12.5 мМ L-фенилаланина. К тому же выбранный диапазон L-фенилаланина имел значительное воздействие и на жизнеспособность клеток: пик жизнеспособности на фоне применяемых 2.5; 5.0 и 7.5 мМ обработок отмечался в пределах 94.5-96% на 12-й день, что после постепенно уменьшалось к 14-ому дню. Результаты анализов указывают также на то, что накопление эфедрина и псевдоэфедрина повышалось в большой степени в процессе роста клеточной культуры, что находилось в строгой корреляции с циклом клеточного роста. Согласно

данным отмечалась и высокая антимикробная активность всех 3-х выбранных видов *Ephedra*, проявляющаяся в увеличении зоны ингибации и степени обозримости по мере увеличения количества экстракта (мг/диск). Согласно тестам диск-диффузии метанольные экстракты диких растений проявляли антимикробную активность против выбранных микроорганизмов при всех применяемых уровнях, причем их антимикробная активность усиливалась при концентрации 4 мг/мл. Было очевидным, что *E. pachyclada* имел наибольшую антимикробную активность против *Bacillus subtilis* (РТСС 1023) с зоной ингибации в  $16 \pm 2$  мм и индексом активности  $0.69 \pm 0.061$ , тогда как зона ингибации для всех остальных видов составляла 10 мм при той же концентрации (4 мг/мл). В то же время, каллус *E. procera* не проявлял никакой антимикробной активности против *Candida albicans*, тогда как экстракты каллуса *E. strobilacea* имели наибольшую зону ингибации среди всех остальных видов. Тем не менее, ясно, что наши каллусные экстракты обладали сравнительно меньшей антимикробной активностью, однако при повышении их концентрации (мг/диск) зона ингибации становилась намного заметнее.

Таким образом, среди всех видов *Ephedra* экстракт каллуса *E. strobilacea* проявил наибольшую антимикробную активность против большинства тестируемых микроорганизмов. Удивительным образом все метанольные экстракты каллусных культур проявляли антимикробную активность против грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (РТСС 1074) даже будучи в минимально применяемой концентрации в 0,5 мг/мл.

По полученным нами результатам дикие растения и каллусы всех трех выбранных видов *Ephedra* обладали антимикробной активностью, несмотря на то, что каллус проявлял ее меньше, чем дикие растения. Следует также отметить, что среди всех видов *Ephedra* метанольный экстракт *E. strobilacea* проявлял наибольшую активность. Нашими тестами Folin Ciocalteu также выявлено, что и дикие растения, и каллус содержали фенолы, а *E. strobilacea* содержал наибольшие количества фенолов по сравнению с остальными выбранными видами:  $504.9 \pm 41.51$  мкмоль экв катехин/г экстракта – для дикого растения, и  $114.61 \pm 15.13$  мкмоль экв катехин/г экстракта – для каллуса. Была выявлена также строгая взаимосвязь между содержанием общего фенола и антиоксидантной и антимикробной активностями в наших образцах.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Различные виды *Ephedra* являются подходящими для продуцирования эфедрина и псевдоэфедрина, и потому возникает существенная необходимость их применения с использованием соответствующей технологии. В связи с этим рекомендуем и далее анализировать разные виды *Ephedra* в *in vitro* условиях и использовать их изолированные клетки для биореакторов на фоне их обработки различными гормональными диапазонами, комбинированными с различными аминокислотами или стимуляторами.

## ВЫВОДЫ

1. В настоящее время вторичные метаболиты и их синтезирование играют важную роль в сегодняшней фармацевтической промышленности. Продуцирование таких метаболитов как эфедрин и псевдоэфедрин, обладающих антимикробными, антиоксидантными свойствами и являющихся ценными алкалоидами, делает *Ephedra* уникальным растением.

2. Разработаны методы получения каллусных культур трех видов лекарственного растения *Ephedra* и суспензионной культуры *E. procera* Fisch et C. A. Mey на среде МС.

3. Изучено влияние различных растительных гормонов на скорость роста и образования биомассы. Установлено, что в каллусной культуре для синтеза эфедрина и псевдоэфедрина применение кинетина, как цитокинин, более целесообразно, чем БАП.

4. Применение четко рассчитанного гормонального состава в *in vitro* культуре *Ephedra* приводит к удовлетворительным результатам. Более того, при применении гормонального диапазона 0.5-2.0 мг/л выбранных цитокинов и ауксина, отмеченные виды *Ephedra* способны образовывать каллус, однако не все гормоны являются достаточно подходящими для поддержания его жизнеспособности. Для каждого соответствующего вида *Ephedra* подходящими являются следующий состав гормонов НУК/кин (мг/л): *Ephedra procera* Fisch et C. A. Mey – 2.0 : 1.0, *Ephedra strobilacea* Bunge – 1.5 : 1.0, *Ephedra pachyclada* Boiss – 2.0 : 0.5.

5. После четвертого пассажа на среде с НУК/кин 2.0 : 1.0 наблюдался 18% ризогенез.

6. У всех видов растений эфедры был изучен выход эфедрина и псевдоэфедрина. Наибольшей активностью эфедрина обладала *E. strobilacea*, а псевдоэфедрин - *E. procera*.

7. *E. procera* по сравнению с остальными видами *Ephedra* проявляла наибольшую способность к росту и накоплению клеток в *in vitro* культуре.

8. В суспензионной культуре *E. procera* также обнаружен эфедрин и псевдоэфедрин.
9. Установлено влияние L-фенилаланина на биосинтез эфедрина и псевдоэфедрина в суспензионной культуре *E. procera*. Наилучший результат обеспечил 7.5 мМ L-фенилаланин.
10. В каллусных культурах и в интактных растениях всех изученных видов *Ephedra* была установлена антиоксидантная активность. У растений антиоксидантная активность в 6 – 8 раза выше, чем у каллусных культур.
11. Растительные и каллусные метанольные экстракты всех изученных видов *Ephedra* обладали антимикробной активностью. Во всех каллусных культурах видов *Ephedra* наблюдалась наиболее высокая антимикробная активность по отношению *Pseudomonas aeruginosa*.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Ali Parsaeimehr, Elmira Sargsyan and Katayoun Javidnia.** A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of *Ephedra*. *Molecules* **2010**, 15(3), 1668-1678; ISSN 1420-3049.
2. **Ali Parsaeimehr, Elmira Sargsyan and Katayoun Javidnia.** Influence of plant growth regulators on callus induction, growth, chlorophyll, Ephedrine and Pseudoephedrine contents in *Ephedra procera*. *Journal of Medicinal Plant Research* **2010** Vol. 4(13), pp. 1308-1317, 4 July ISSN 1996-0875.
3. **Ali Parsaeimehr, Elmira Sargsyan and Katayoun Javidnia.** Content of Ephedrine and Pseudoephedrine in three species of *Ephedra* *in vitro* and *in vivo* conditions. *Bulletin of State Agrarian University of Armenia Research* **2010**, pp. 62-64, ISSN 1829-0000.
4. **Ali Parsaeimehr, Elmira Sargsyan and Katayoun Javidnia.** The content of secondary metabolites of *Ephedra* for pharmaceutical production. *Biopharma-2010 from science to industry* **2010** pp. 33.
5. **Ali Parsaeimehr.** L- Phenylalanine increased Ephedrine and Pseudoephedrine production in *E. procera* suspension culture. IXI International Syposium "Non-traditional Plant Cultivation Selection and Genetics Ecology and Health" Alushta, Ukraine **2010**, pp. 519-525.

## ԱԼԻ ՓԱՐՍԱԵԻՄԵՀՐ

«Էֆեդրայի տեսակների, դրանց երկրորդային մետաբոլիտների ուսումնասիրությունը *in vitro* մշակույթում և կենսատեխնոլոգիայի մշակումը»

### ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

**Հանգուցային բառեր**՝ Էֆեդրա, կալլուս, *in vitro*, կախության լուծում, ՄՄ սննդամիջավայր, Էֆեդրին, պսևդոէֆեդրին, ՆՔԹ, կինետին, ԲԱՊ:

Ատենախոսությունը նվիրված է մեծ պահանջարկ ունեցող դեղաբույս *Ephedra L. (E.)* ուսումնասիրությանը, որը օժտված է բարձր մետաբոլիկ ակտիվությամբ և գնահատվում է հատկապես Էֆեդրինի և պսևդոէֆեդրինի պարունակության շնորհիվ:

Աշխատանքի հիմնական նպատակն է եղել Իրանի կենտրոնական շրջաններում աճող *Ephedra 3* վայրի տեսակների՝ *E.strobilacea* Bunge, *E. procera* Fisch et C. A. Mey, *E. pachyclada* Boiss, կալլուսային, իսկ *E. procera* կախության լուծումի աճեցումը ժամանակակից մեթոդների կիրառմամբ, երկրորդային մետաբոլիզմի ուսումնասիրությունը մեկուսացված կուլտուրայում, օպտիմալ պայմանների ընտրությունը բջիջների աճի և երկրորդային մետաբոլիտների կենսասինթեզի համար:

Իրականացվել է կալլուսի ինդուկցիա ՄՄ սննդամիջավայրում, որոշվել է 3 տեսակների *Ephedra* բջիջների աճման ակտիվությունը տարբեր հորմոնալ նյութերի և խտությունների դեպքում:

Բնութագրվել են *Ephedra* կալլուսի տեսակները և ընտրվել է համապատասխան կալլուս կախության լուծումի աճեցման նպատակով:

Պարզվել է, որ *E. Procera* մյուս տեսակների համեմատ ցուցաբերել է բջիջների աճի և կուտակման ամենաբարձր ակտիվություն *in vitro* մշակույթում:

Աճեցվել է կախության լուծումի *E. Procera* տեսակից:

Հաստատուն աճող կալլուսային և կախության լուծումի կուլտուրաներում որոշվել է կալլուսային հյուսվածքների կենսասինթեզիկ հնարավորությունը և ակտիվության բարձրացումը տարբեր հորմոնալ նյութերի և խտությունների դեպքում:

Հաստատվել է, որ ԲԱՊ-ի համեմատ կինետինի (կին.) օգտագործումը, որպես ցիտոկինին ավելի նպատակահարմար է կալլուսային կուլտուրայում Էֆեդրինի և պսևդոէֆեդրինի սինթեզի համար:

Ճշտվել է մեկուսացված կուլտուրայում *Ephedra* յուրաքանչյուր տեսակի բջիջների կենսունակության պահպանման համապատասխան հորմոնալ միջավայրը՝ ՆՔԹ/կին. (մգ/լ) *Ephedra strobilacea* - 1.5 : 1.0, *Ephedra procera* - 2.0 : 1.0, *Ephedra pachyclada* - 2.0 : 0.5:

Դիտվել է արմատառաջացման 18%, կալլուսի 4-րդ վերատնկումից հետո, սննդամիջավայրում ՆՔԹ/կին. (մգ/լ) 2.0:1.0 խտության դեպքում:

Պարզվել է, որ կինետինով մշակումը հանգեցնում է բջջային զանգվածի առավելագույն աճի, որը և բերում է Էֆեդրինի  $108.1 \pm 0.6$  մկգ/գ և պսևդոէֆեդրինի  $730.3 \pm 1.0$  մկգ/գ չոր զանգված, ինչպես նաև ընդհանուր քլորոֆիլի պարունակության  $118.4 \pm 7.6$  մկգ/մգ չոր զանգված աճի:

Հայտնաբերվել է փոխադարձ կապ սննդամիջավայրի աուքսինի խտության ավելացման, կալլուսի ինդուկցիայի արագության և ժամանակի միջև:

Պարզվել է, որ ՆՔԹ-ի 2.0 մգ/լ առկայության դեպքում կալլուսի ինդուկցիայի արագացումը բերում է ինդուկցիայի ժամանակի կրճատման:

Հայտնաբերվել է *Ephedra* բոլոր նշված տեսակների վայրի բույսերի և կալլուսային կուլտուրաների մեթանոլային էքստրակտների հակամիկրոբային ակտիվություն գրամդրական, գրամբացասական բակտերիաների և սնկերի նկատմամբ, որը վայրի բույսերում բարձր է եղել կալլուսի համեմատ:

Պարզվել է, որ հետազոտված *Ephedra 3* տեսակները ցուցաբերել են առավելագույն հակամիկրոբային ակտիվություն *Pseudomonas aeruginosa* նկատմամբ:

Որոշվել է էքստրակտների հակաօքսիդանտային հատկությունը և պարզվել, որ *E. strobilacea*  $1.61 \pm 0.08$  մմոլ էկվ կվերցետին/գ էքստրակտ չափաքանակով վայրի բույսի և  $0.278 \pm 0.02$

մնու էկվ կվերցետին/գ էքստրակտ չափաքանակով կալլուսի համար ցուցաբերել է առավելագույն արդյունք:

Հայտնաբերվել է ֆենոլի պարունակություն *Ephedra* բոլոր ուսումնասիրված տեսակներում, ընդ որում *E. strobilacea* ֆենոլի առավելագույն քանակ՝ վայրի բույսի դեպքում՝  $504.9 \pm 41.51$  մկմոլ էկվ կատեխին/գ էքստրակտ և կալլուսի դեպքում՝  $114.61 \pm 15.13$  մկմոլ էկվ կատեխին/գ էքստրակտ:

Կատարվել է L-ֆենիլալանինի ազդեցության ուսումնասիրություն *E. procera* բջջային աճի, նրանցում էֆեդրինի և պսևդոէֆեդրինի պարունակության վերաբերյալ կախությային կուլտուրայում:

Որոշվել է *E. procera* կախությային կուլտուրայում, L-ֆենիլալանինի տարբեր խտություններում կորրելացիոն կապը էֆեդրինի, պսևդոէֆեդրինի և բույսի աճման կարգավորիչների միջև:

Պարզվել է, որ կախությային կուլտուրայում էֆեդրինի և պսևդոէֆեդրինի (համապատասխանաբար  $112.77 \pm 0.54$  մկգ/գ և  $588.68 \pm 1.84$  մկգ/գ չոր զանգված) առավելագույն պարունակություն գրանցվում է 12-րդ օրը 7.5 մմոլ L-ֆենիլալանինի ազդեցության պայմաններում:

Ստացված արդյունքների հիման վրա առաջարկվում է մշակված կենսատեխնոլոգիայի ներդրում՝ կենսատեխտորներում էֆեդրինի և պսևդոէֆեդրինի արտադրության նպատակով:

## ALI PARSAEIMEHR

“Investigation of Ephedra Spp *in vitro*, its secondary metabolites and development of Biotechnology”

### SUMMERY

**Key words:** *Ephedra*, callus, *in vitro*, suspension culture, MS medium, ephedrine, pseudoephedrine, NAA, kinetin, BAP

Investigations were carried out to analyse demanded medicinal plant *Ephedra*, which has highly metabolic activity and valuable for ephedrine and pseudoephedrine production.

The main purpose of the work was arranged base using new methods to induce callus of 3 species of *Ephedra* (*Ephedra strobilacea* Bunge, *Ephedra procera* Fisch et C. A. Mey, *Ephedra pachyclada* Boiss) grown in the central part of Iran, to conduct suspension culture of *E. Procera*, to investigate the secondary metabolism in isolated culture, to choose the optimal conditions for cell growth and biosynthesis of secondary metabolites. Callus induction was performed on MS medium and cell growth of three species of *Ephedra* in different hormonal ranges had been determined. Callus from *Ephedra* species were characterized and the suitable callus was chosen to be grown in suspension culture. It was found out that *E. procera* compared with the other species had recorded the highest cell growth and accumulation in *in vitro* culture. In the stable growing callus and suspension culture cells were analyzed for their biosynthetic ability and probably promoted activity of callus under different hormones and hormonal ranges. It was found out that Kin as a cytokinin was more suitable than BAP for callus induction and ephedrine and pseudoephedrine production. The hormonal range for cell growth of every *Ephedra* species was determined as follow NAA/Kin ( $\text{mg l}^{-1}$ ) *Ephedra strobilacea* 1.5:1.0, *Ephedra procera* 2.0:1.0 and *Ephedra pachyclada* 2.0:0.5. After 4<sup>th</sup> subculture in the 18% of the treatments on the medium contained NAA/Kin ( $\text{mg l}^{-1}$ ) 2.0:1.0 rhizogenesis occurred. It was found out that cultures where Kin had been used the highest cell biomass were recorded with production of  $108.1 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight ephedrine and  $730.3 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight pseudoephedrine and total chlorophyll content  $118.4 \pm 7.6 \mu\text{g mg}^{-1}$  dry weight. There is a correlation between time and callus induction rate as by increasing the NAA to 2.0 mg/l the callus induction rate increased and callus induction time significantly decreased. All methanolic extracts of mentioned *Ephedra* species in wild plants and callus showed antimicrobial activity against gram negative, gram positive bacteria and also fungi, but antimicrobial activity of the wild plants was determined higher compared with callus. The 3 investigated *Ephedra* species showed the highest antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The experiments were carried out to determine the antioxidant activity of extracts and considerably *E. strobilacea* showed the highest results  $1.61 \pm 0.08$  mmol eq quercetin/g extract for wild plant and  $0.278 \pm 0.02$  mmol eq quercetin/g extract for callus.

In addition, all *Ephedra* species had phenol contents but *E. strobilacea* recorded the highest amount  $504.9 \pm 41.51 \mu\text{mol eq catechin/g}$  extracts for wild plants and  $114.61 \pm 15.13 \mu\text{mol eq catechin/g}$  extracts for callus. Another study was conducted to analyze the influence of L-phenylalanine on cell growth and ephedrine and pseudoephedrine production in suspension culture for *E. procera*. And also a correlated connection was determined among L-phenylalanine ranges and ephedrine, pseudoephedrine and plant growth regulators. As a result the highest amount of ephedrine and pseudoephedrine production was achieved on 12<sup>th</sup> day under the influence of 7.5 mM L-phenylalanine ( $112.77 \pm 0.54 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight and  $588.68 \pm 1.84 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, respectively).

Practically the obtained results can be a useful recommendation for the usage of this biotechnological method in bioreactors for ephedrine and pseudoephedrine production.