

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

Ղարեհ-Մատրոսյան Սորմեհ Մերգիսի

ԻՐԱՆԻ ՖԼՈՐԱՅԻ *CITRULLUS COLOCYNTHIS* (L.) SCHARD., *ARTEMISIA AUCHERI* BOISS. ԵՎ *ONOSMA SERICEUM* WILLD. ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՐԿՐՈՐԴԱՅԻՆ ԱՐԳԱՄԻՔՆԵՐԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՈՐՈՇ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

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

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

Гарей-Матроссян Сормей Сергисовна

**ОБРАЗОВАНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
ИЗОЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР *CITRULLUS COLOCYNTHIS* (L.) SCHARD.,
ARTEMISIA AUCHERI BOISS. И *ONOSMA SERICEUM* WILLD. ФЛОРЫ
ИРАНА**

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН - 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Յու.Գ. Պոպով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ, պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան
կ.գ.թ. Ե.Ն. Շչերբակովա

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան
հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. մայիսի 13-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

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

Սեղմագիրը առաքված է 2016 թ. ապրիլի 13-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на биологическом факультете ЕГУ.

Научный руководитель: д.б.н., профессор Ю.Г. Попов

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян
к.б.н. Е.Н. Щербакова

Ведущая организация: Институт проблем гидропоники
им. Г.С. Давтяна НАН РА

Защита диссертации состоится 13 мая 2016 г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

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

Автореферат разослан 13 апреля 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Применение растений в фитотерапии восходит к античности. Еще древние египтяне, греки, китайцы, армяне, иранцы и др. использовали растения в народной медицине в качестве средств для лечения различных заболеваний. Показано, что помимо основных компонентов растения производят такие сложные природные продукты как флавоноиды, алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, антибиотики, эфирные масла и др. Многие из этих так называемых «вторичных продуктов» широко используются в медицине, и в настоящее время четвертая часть всех фармацевтических препаратов изготавливается на базе растительных веществ. Одним из распространенных заболеваний современности является рак. Применяемые средства против раковых опухолей чрезвычайно дороги, а в некоторых случаях даже не действенны. Многие ученые в настоящее время заняты поиском эффективных раковых средств из новых источников, в том числе и из растений (Awal et al., 2004).

Ценными лекарственными растениями являются колоцинт *Citrullus colocynthis*, виды из родов *Artemisia* и *Onosma*. Этанольные экстракты из плодов, листьев и стеблей колоцинта обладают ярко выраженным антибактериальным эффектом. Кроме того, кукурбитадиновые гликозиды, извлеченные из листьев *Citrullus colocynthis*, проявляют плеiotропное воздействие на клетки, вызывая остановку клеточного цикла и апоптоз, и, следовательно, могут иметь терапевтическое действие против клеток рака молочной железы (Tannin-Spitz et al., 2007).

Эфирные масла из растений рода *Artemisia* также показали высокую антимикробную и противогрибковую активность (Verdian-rizi, 2009). Основными соединениями, синтезируемыми растениями рода *Onosma*, являются шиконин и его производные, обладающие высокой цитотоксичностью (Ozgen et al., 2006). Показано также, что шиконин и его производные проявляют ценные лечебные свойства против бактериальных инфекций, рака и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (Chen et al., 2003).

Однако для удовлетворения растущего спроса на лекарственные препараты растительного происхождения и ввиду ограниченности ареала распространения видов ставится вопрос о дополнительной сырьевой базе.

Культивирование растительных тканей и клеток в условиях *in vitro* дает возможность получать ценные метаболиты вне зависимости от места произрастания растения и времени года, т.е. создать дополнительную сырьевую базу для пищевой, медицинской и косметической промышленности. В связи с этим исследования вторичного метаболизма культивируемых клеток высших растений приобретают особую актуальность. Это обусловлено прежде всего перспективой промышленного получения соединений специализированного обмена растений, а также возрастающей остротой экологических проблем (загрязненность почвы радионуклидами, пестицидами и нефтепродуктами). Учитывая также непрерывное уменьшение

природных запасов, становится очевидной необходимостью замены дикорастущего сырья на гарантированно получаемую промышленным способом биомассу культивируемых клеток, содержащую необходимые соединения в достаточном количестве.

Оптимизация условий выращивания тканей и применение биотических и абиотических факторов для индукции биосинтеза вторичных продуктов могут привести к получению культур с высоким уровнем содержания в них ценных метаболитов.

Цель и задачи исследования. Целью проведенных исследований являлась разработка приемов для эффективной реализации биохимических потенциалов культивируемых тканей в системе *in vitro* и получение биотехнологического источника экологически чистого сырья, имеющего практическую ценность. Для выполнения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

Разработать условия образования каллуса из эксплантов *Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri* и *Onosma sericeum*, произрастающих на территории Ирана.

Исследовать закономерности роста каллусов и влияние химических веществ и гормонального баланса в культуральной среде.

Изучить биосинтетические потенциалы полученных изолированных культур и определить антибактериальную и антиоксидантную активности и цитотоксичность синтезируемых вторичных метаболитов.

Научная новизна. Получены изолированные культуры *Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri* и *Onosma sericeum*, растущие на искусственных питательных средах и сохраняющие способность к образованию продуктов вторичного обмена; разработаны условия для клонального микроразмножения *Citrullus colocynthis*; исследовано образование в клеточных культурах *Artemisia aucheri* и *Onosma sericeum* соединений с цитотоксической, антимикробной и антиоксидантной активностями. Изучены зависимость роста и биосинтетическая активность изолированных культур от наличия гормональных факторов в питательной среде. Разработаны условия получения пигментированного каллуса *Onosma sericeum* с повышенным содержанием шиконина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований имеют научное значение, так как полученные культуры изученных видов растений могут быть использованы как модельные системы для более глубокого изучения путей биосинтеза специфических физиологически активных соединений. А по своей продуктивности полученные каллусные культуры *Artemisia aucheri* и *Onosma sericeum* представляют также непосредственный практический интерес как потенциальный источник ценных физиологически активных веществ и могут быть использованы в промышленных масштабах для массового выращивания.

Основные положения, выносимые на защиту. Результаты исследования посвящены:

- Получению каллусных тканей колоцинта, полыни и оносмы и изучению динамики их роста. Регенерации из каллуса растений колоцинта и их адаптация к тепличным условиям.
- Цитотоксическому действию метанольных экстрактов каллусных тканей полыни и оносмы на креветки *Artemia franciscana*.
- Определению антиоксидантной активности метанольных экстрактов полыни и оносмы.
- Антимикробной активности метанольных экстрактов полыни и оносмы.
- Зависимости синтеза шиконина в каллусной ткани оносмы от гормонального состава питательной среды.

Апробация. Материалы диссертации были представлены на заседании кафедры микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов ЕГУ, на международной конференции, посвященной 70-летию Института ботаники и ботанического сада (Ереван, 2008).

Место выполнения работы. Основная работа проводилась на кафедре микробиологии и биотехнологии микроорганизмов и растений биологического факультета ЕГУ (Ереван, Армения) и частично в лаборатории “Ария Саламат Рази”, связанной с Лабораторией Иранской Стандартной Аккредитации (Тегеран).

Публикации. 6 публикаций, включающих 5 статьи и 1 тезиса, основанные на экспериментальных данных, были опубликованы в различных журналах и сборниках тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, полученных результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 17 таблиц и 49 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре представлены сведения о метаболической активности растений и использовании изолированных культур для производства биологически активных вторичных метаболитов. Приводятся данные о факторах, способствующих повышению продукции вторичных метаболитов в изолированных тканях. Ввиду того, что объектами исследования являются растения *Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri* и *Onosma sericeum*, произрастающие на территории Ирана, более подробно приводятся данные о синтезе продуктов вторичного обмена в этих растениях и их физиологическом значении.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись каллусные культуры колоцинта (*Citrullus colocynthis* L. Schard.), полыни (*Artemisia aucheri* Boiss.) и оносмы (*Onosma sericeum* Willd), полученные общепринятым методом. Каллусные ткани колоцинта и полыни были получены из частей растений, выращенных из стерильно пророщенных семян в

условиях *in vitro*. Каллусная ткань ономы была получена из листьев интактного растения. Семена колоцинта стерилизовались концентрированной серной кислотой в течение 30 минут и отмывались в трех порциях стерильной воды. Для ускорения прорастания они обрабатывались раствором гибберелловой кислоты GA₃. Семена и экпланты полыни и ономы стерилизовались 2,0% или 1,5% раствором NaOCl, соответственно.

Для инициации и роста каллусных тканей использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с различными сочетаниями и концентрациями витаминов и гормональных соединений – бензиламинопурина (БАП), кинетина, индол-3-уксусная кислота (ИУК), α-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D). Каллусные ткани колоцинта и полыни выращивались при температуре 28°±1° в условиях темноты. Культура ономы была разделена на две группы. Первая группа инкубировалась в термостате при температуре 25°С ±1° в темноте, вторая – при температуре 25°С ±1° при фотопериоде 16/8 (свет/темнота). Длительность пассажа для колоцинта и полыни составляла 4 недели, для ономы – 6 недель.

Об интенсивности ростовых процессов судили по следующим показателям: сырой вес ткани в г; сухой вес ткани в %, индекс роста. Статистический анализ проводился с использованием SPSS версии программного обеспечения ANOVA. Средние значения различных вариантов сравнивались с использованием теста Дункана (p<0,05).

Для цитологических исследований из свежего каллуса нарезались тонкие пластины и исследовались под световым микроскопом.

Для приготовления экстрактов навеску сухой ткани интактного растения (10 г) и сухой каллусной ткани (3-5 г) полыни и ономы заливали метанолом (100 мл и 50 мл, соответственно) и оставляли на 72 часа при комнатной температуре. Затем экстракт фильтровали и выпаривали на ротаторном испарителе. Сухой экстракт хранили при 4°С для дальнейшего использования.

Оценка цитотоксичности. Токсичность экстракта (LC₅₀) оценивалась с помощью креветок *Artemia franciscana* по общепринятой методике (D'Souza et al., 2002). По 10 личинок помещалось в 10 мл морской воды, содержащей экстракт образцов в различных концентрациях: для экстракта интактного растения полыни – это от 18 до 1000 мкг/мл; для экстракта каллуса полыни – от 30 до 2000 мкг/мл. Для ономы экстракт растворяли в DMSO (не более 50 мкл в 5 мл раствора), плюс морская вода, чтобы концентрация была от 62,5 до 2000 мкл/мл. Контролем служили морская вода, смесь морской воды с DMSO и адрибластин (0,1 мг/мл). Подсчет мертвых организмов проводили через 24 часа после воздействия экстракта. Все опыты проводили в трех повторностях для каждой концентрации. Значения LC₅₀ были рассчитаны с использованием пробит метода (Finney, 1971).

Антиоксидантная активность метанольных экстрактов исследуемых тканей была определена при помощи 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH) свободнорадикального метода (Brand-Williams et al., 1995). Готовились различные

концентрации экстракта: для полыни – 10, 50, 100, 150 и 200 мкг/мл, для оносмы – 1000, 2000 и 3000 мкг/мл в 50% растворе метанола. Реакционная смесь содержала 3 мл 0,060 мМ DPPH в метаноле и 200 мкл раствора экстракта. Через 30 минут при комнатной температуре на спектрофотометре измерялись значения оптической плотности (Abs) при 517 нм. Эталонном служила галловая кислота и 50% раствор метанола в качестве контроля. Опыты проводились в трех повторностях. Способность поглощать DPPH радикал рассчитывалась по формуле:

DPPH радикал поглощающей активности (%) = [(Abs контроль – Abs образца) / Abs контроль] x 100.

При определении антимикробной активности тест-микроорганизмами служили 4 штамма бактерий - *Bacillus subtilis* (ATTC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhi* (PTCC 1609) и *Escherichia coli* (ATCC 25922) и два штамма грибов - *Aspergillus niger* (PTCC 5012) и *Candida albicans* (ATCC 10231). Суспензия микроорганизма распределялась по поверхности агара. Затем в агаре проделывались лунки диаметром 6 мм. В лунки закапывали по 50 мкл метанольного экстракта, содержащего 5 мг сухого экстракта. Чашки хранили 24 часа при 4°C в холодильнике, затем переносились в термостат и инкубировались при 37°C в течение 24 часов (для бактерий) и при 24°C в течение 48 часов (для грибов). Антимикробная активность оценивалась по диаметру зоны отсутствия роста вокруг лунки. Контролем служили 0,01 % растворы ципрофлоксацина, гентамицина и ампициллина (для бактерий) и 1% нистатина и клотримазола (для грибов), а также метанол. Анализ проводили в трех повторностях.

Хроматографический анализ метанольных экстрактов каллусной ткани и корня интактного растения оносмы проводили методом ВЭЖХ (Toson BIOSCIENCE, Japan). Условия хроматографирования: колонка TSK гель ODS – 80 TS, 150 x 4,6 мм, метанол : вода : уксусная кислота (70:28:2 v/v/v). Скорость элюции 1 мл/мин. В колонку вводили 50 мкл экстракта образца. Количество шиконина измерялось при длине волны 245 нм. Стандартом служил метанольный раствор шиконина. Время удерживания стандарта шиконина составляло 7,15 мин. Идентификацию проводили сравнением времени удерживания исследуемого компонента с временем удерживания стандарта.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 *Citrullus colocynthis*

В наших экспериментах успешное нарушение покоя семян колоцинта наблюдалось при обработке их раствором гибберелловой кислоты. Наибольший процент всхожести семян получен при концентрации гиббереллина 10 мг/л. Каллусная ткань колоцинта была получена из различных эксплантов. Однако при дальнейшем пассировании рост каллуса замедлялся и к 9 пассажу прекращался. Поэтому была проведена работа по индукции органогенеза в каллусной ткани и

клональному микроразмножению колоцинта. Выяснилось, что из всех испытанных сред наилучшей оказалась среда МС, содержащая кинетин и ИУК по 1 мг/л. На этой среде формировалось наибольшее количество адвентивных побегов ($11,8 \pm 0,6$), и к 35 дню культивирования длина их достигала своего максимума 6-7 см. (рис 1).

Для индукции ризогенеза побеги черенковались, и черенки длиной 2,0 – 2,5 см переносились на питательную среду с 1 мг/л ИУК. Укорененные растения затем переносились в субстрат для дальнейшего роста.

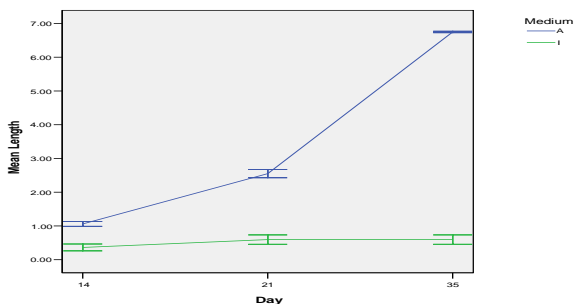


Рис.1. Влияние состава среды на длину побегов *C.colocyntis*

3.2 *Artemisia aucheri*

Каллусная ткань полыни была получена на всех 6 испытанных нами средах. Однако в зависимости от гормонального состава среды наблюдались различия в морфологии и характере роста ткани. Так, при сочетании кинетина (2 мг/л) с ИУК (0,1 или 1,0 мг/л) и 2,4 -D (1,0 или 0,1 мг/л) каллус был кремового цвета и хрупкий с наибольшим индексом

роста. На средах, содержащих БАП (2-3 мг/л) и НУК (0,1 или 0,5 мг/л), каллусная ткань была беловатого цвета и рыхлая, а индекс роста снижался. Среда, содержащая по 1 мг/л кинетина и ИУК, способствовала образованию из каллуса многочисленных побегов.

Предварительные опыты по определению цитотоксичности экстрактов каллусных тканей полыни, выращенных на различных питательных средах, показали, что на питательной среде, содержащей 3 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК, при снижении роста эффект цитотоксичности по отношению к креветкам возрастал. Исходя из этого было проведено изучение динамики роста каллусной ткани на данной среде и определение предельной концентрации экстракта с цитотоксическим действием (LC_{50}).

Увеличение сырой массы ткани на данной питательной среде происходит по нарастающей кривой, начиная с шестых суток культивирования до тридцатых, после чего рост начинает замедляться. Первый пик увеличения процентного содержания сухого вещества наблюдается на 12 сутки культивирования, что связано, возможно, с интенсивным делением клеток. На 15-16 сутки сухой вес резко падает, в то время как

сырой вес возрастает. Вероятно в этот период увеличение сырого веса происходит за счет вакуолизации клеток. До 24 суток культивирования сухой вес почти не меняется. На 27 сутки, когда наблюдается сильное возрастание сырого веса, сухой вес снижается, а к 30 суткам вновь увеличивается (рис. 2).

При изучении **цитотоксичности** каллусной ткани полыни в качестве контроля использовался экстракт интактного растения. Результаты показали, что из использованных концентраций экстракта растения от 18 до 1000 $\mu\text{г}/\text{мл}$ в течение 24 часов летальная концентрация (LC_{50}) была 35 $\mu\text{г}/\text{мл}$ (рис.3).

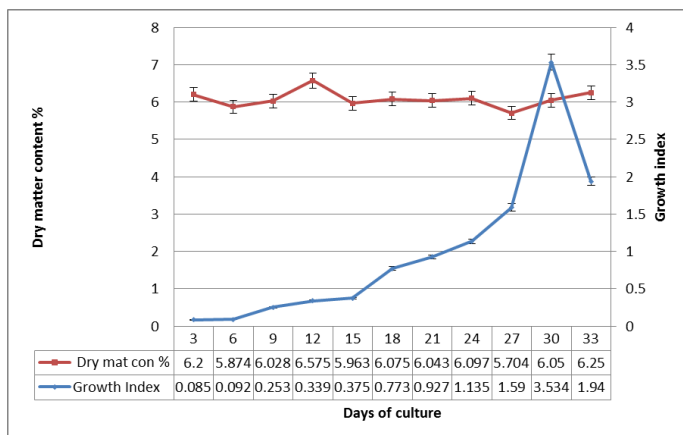


Рис. 2. Динамика роста каллусной культуры *A. aucheri*

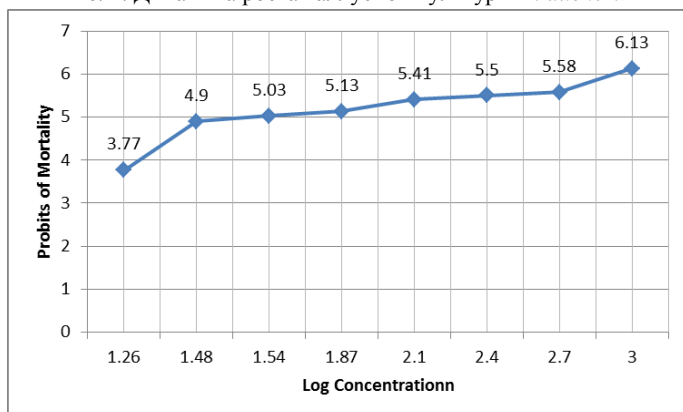


Рис. 3. Цитотоксичность экстракта *A. aucheri* на *Artemia franciscana*

Для определения цитотоксичности экстракта каллусной ткани, выращенной на питательной среде с 3 $\text{мг}/\text{л}$ БАП и 0,5 $\text{мг}/\text{л}$ НУК, использовались концентрации от 35

до 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в течение 24 часов. Выяснилось, что каллусные ткани пятого и десятого пассажей при использовании концентрации экстракта 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ обладали низкой цитотоксичностью. С увеличением срока культивирования токсичность экстракта возрастала (рис. 4).

При снижении в питательной среде концентраций БАП и НУК (2 мг/л и 0,1 мг/л, соответственно) цитотоксический эффект экстракта каллусной ткани снижался. А при использовании в качестве регуляторов роста кинетина, ИУК и 2,4-D цитотоксический эффект экстракта каллусной ткани не наблюдался.

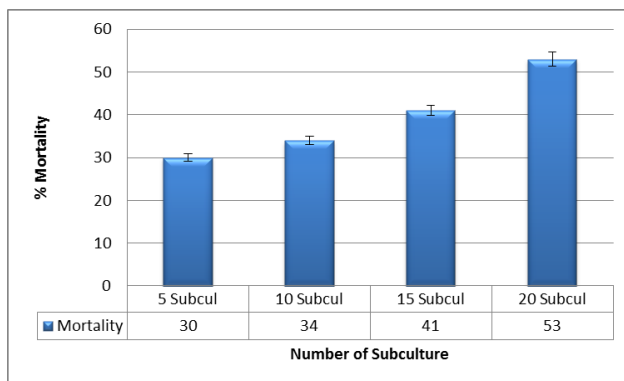


Рис. 4. Гибель *Artemia franciscana* под действием экстракта каллуса *A. aucheri* разных пассажей.

Из всего вышеизложенного следует, что синтез вторичных продуктов в каллусной ткани полыни находится под гормональным контролем; БАП и НУК способствуют синтезу веществ с токсическим действием.

Определение **антиоксидантной активности** метанольного экстракта ткани полыни показало, что 50%-ное ингибирование (IC_{50}) радикала DPPH наблюдалось при концентрации 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$, что эквивалентно действию галловой кислоты в концентрации 8,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. То есть экстракт полыни обладал слабой ингибирующей активностью против DPPH радикалов (рис. 5).

Метанольные экстракты как интактного растения полыни, так и каллусных тканей не обладали **антимикробной активностью** – не ингибировали рост тестируемых микроорганизмов.

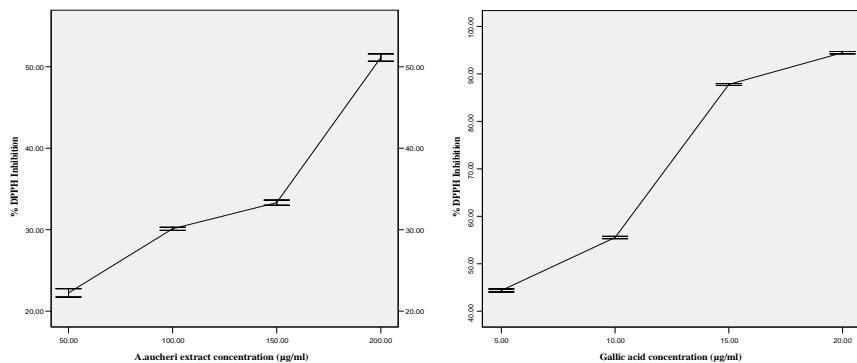


Рис. 5. Антиоксидантная активность экстракта каллусной ткани *A. aucheri*

3.3. *Onosma sericeum*

Из 14-и испытанных питательных сред пролиферация каллусной ткани из листовых и корневых эксплантов *Onosma sericeum* наблюдалась только на пяти средах. При этом каллусы различались как по цвету (белый, желтоватый, красно-коричневый), так и по консистенции (твердый, рыхлый, мягкий) в зависимости от состава питательной среды. Каллусная ткань, растущая на питательной среде МС без ионов аммония, в присутствии БАП (3 мг/л) и НУК или ИУК (0,5 мг/л) и в условиях темноты, была красно-коричневого цвета. Как выяснилось в дальнейшем, пигментация была обусловлена синтезом в ткани шиконина. Цитологические исследования показали, что пигменты накапливаются в паренхимных клетках, расположенных группами в неорганизованной каллусной ткани. И только незначительное количество пигментов выделяется в культуральную среду. При изучении динамики роста каллусной ткани *Onosma sericeum* следует отметить, что lag фаза длится до 12 суток, после чего начинается экспоненциальная фаза роста. Длительность пассажа составляет 39-40 дней, и к этому времени происходит накопление пигментов в каллусной ткани.

Первый пик увеличения процентного содержания сухого веса наблюдается на 12 сутки, что связано с интенсивным делением клеток. Второе возрастание количества сухого вещества наблюдается на 21 сутки, в период интенсивного роста ткани, после чего сухой вес снижается. В этот период рост происходит, по всей вероятности, за счет вакуолизации клеток. К концу пассажа сухой вес вновь увеличивается, возможно за счет повышенного синтеза пигментов (рис. 6).

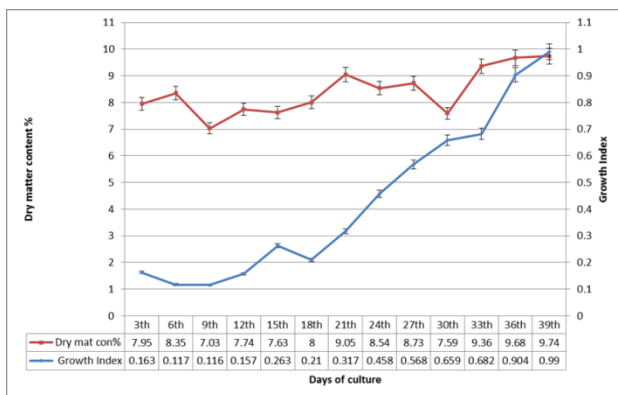


Рис. 6. Динамика роста каллусной культуры *O. sericeum*

Дальнейшие эксперименты проводились с целью выяснения влияния состава питательной среды на рост и синтез пигментов в каллусной ткани аносмы, а также для выяснения функциональной разницы между ИУК и НУК в гормональной регуляции синтеза шиконина. С помощью ВЭЖХ было идентифицировано наличие шиконина в каллусной ткани аносмы (рис. 7).

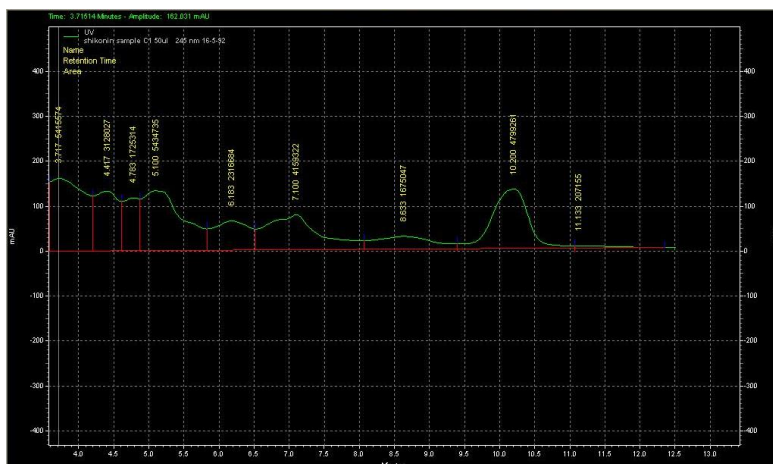


Рис. 7. Хроматограмма экстракта каллусной ткани аносмы. Пик шиконина при Rt 7.100

Как видно из табл. 1 и рис. 8 каллусы по-разному реагировали на различные питательные среды. Так, при наличии в среде ионов аммония (среды В и В₂)

отмечался интенсивный рост каллуса независимо от наличия в среде ИУК или НУК, однако синтеза шиконина не происходило. Исключение из среды аммония способствовало синтезу шиконина в ткани ономы. Причем в этом случае наблюдалась регулирующая роль НУК на синтез пигмента. Так, после 10 пассажа в присутствии ИУК, когда сухой вес составлял 4,52%, количество шиконина было 9,85 мг/г сухого вещества. Замена ИУК на НУК способствовала усилению синтеза шиконина (15,26 мг/г сухого вещества), равно как и замена ионов К на ионы Na (27,71 мг/г сухого вещества). С увеличением общего возраста культуры (20-ый пассаж) синтез шиконина усиливался и достигал 130,1 мг/г сухого вещества на среде 3, что было в 11,5 раз больше, чем в корнях растения. (рис. 8).

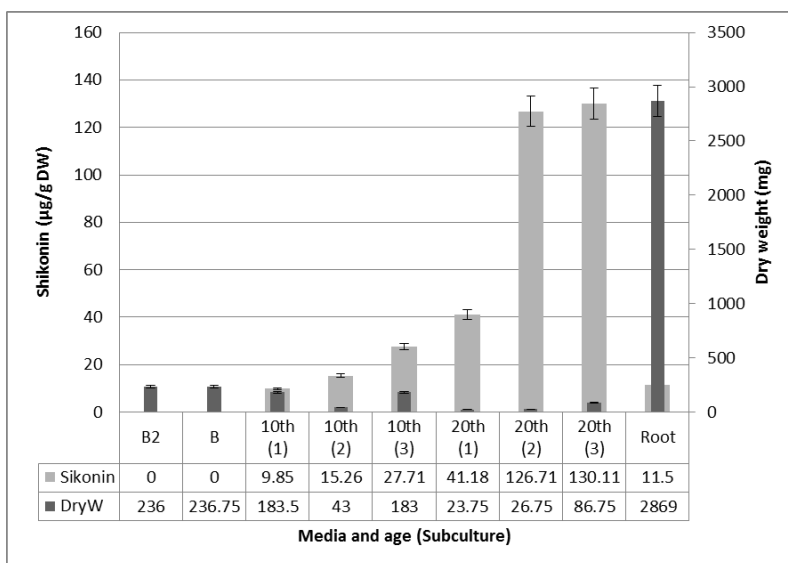


Рис. 8. Сухой вес и синтез шиконина в каллусной ткани ономы 10 и 20 пассажа, выращенной на средах различного состава: **B**= MS + KH_2PO_4 + 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA; **B**₂= MS + KH_2PO_4 + 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA; **1**= MS (ammonium ion-free)+ KH_2PO_4 + 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA; **2**= MS (ammonium ion-free)+ KH_2PO_4 + 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA; **3**= MS (ammonium ion-free)+ NaH_2PO_4 + 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA

Таблица 1.

Зависимость роста каллусной ткани *O. sericeum* и синтеза шиконина от состава питательной среды

Состав среды	Код среды	Сырой вес, мг	Сухой вес, мг	Сухой вес, %	Шиконин мг/г сухого вещества
МС+КН ₂ РО ₄ +3 мг/л БАП+0.5 мг/л ИУК	В	10115.50 ^c	236.75 ^b	2.39 ^a	0.0 ^a
МС+КН ₂ РО ₄ +3 мг/л БАП+0.5 мг/л НУК	В2	9785,75 ^c	236.00 ^b	2.03 ^a	0.0 ^a
МС (без NH ₄ ⁺)+КН ₂ РО ₄ +3 мг/л БАП+0.5 мг/л ИУК	1	4078,25 ^b	183.50 ^b	4.52 ^b	9.85 ^b
МС (без NH ₄ ⁺)+КН ₂ РО ₄ +3 мг/л БАП+0.5 мг/л НУК	2	454.00 ^a	43.00 ^a	9.51 ^c	15.26 ^c
МС (без NH ₄ ⁺)+КН ₂ РО ₄ +3 мг/л БАП+0.5 мг/л НУК	3	1859.60 ^a	183.00 ^b	10.00 ^c	27.71 ^d

Примечание: различные буквы в колонках означают, что по тесту множественного диапазона Дункана значения существенно отличаются от P < 0,05

Свет также является фактором, определяющим образование пигмента в культуре оносмы. Было замечено, что синтез пигмента подавлялся при облучении культур белым светом, хотя на рост он почти не влиял.

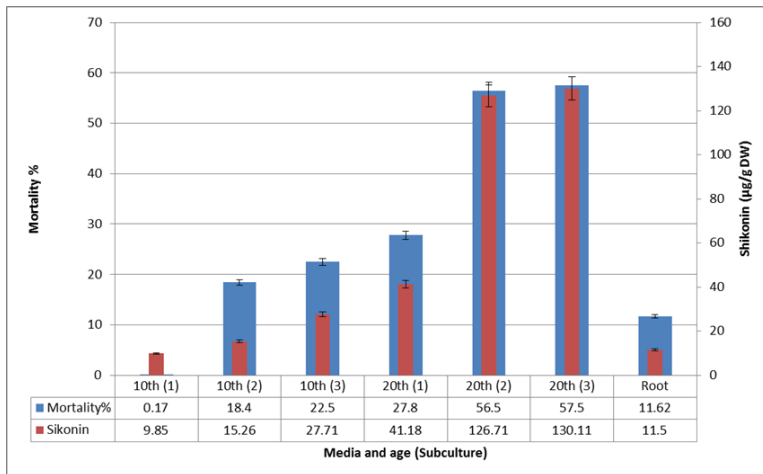


Рис. 9. Гибель *Artemia franciscana* под действием экстрактов каллусных тканей 10 и 20 пассажей, выращенных на средах различного состава

В опытах по обнаружению эффекта цитотоксичности использовались экстракты каллусной ткани оносмы, выращенной на различных питательных средах и разного возраста. Полученные данные приведены на рис. 9. Выяснилось, что экстракт ткани, выращенной на среде 3 с НУК, обладал наибольшей цитотоксичностью. Летальная концентрация (LC_{50}) была менее 1000 $\mu\text{г/мл}$. Возраст культуры также оказывал влияние на токсичность экстракта. Сравнивая экстракты культур 10 и 20 пассажей можно заметить, что с увеличением общего возраста культуры токсичность экстракта возрастает в 2,5 – 3 раза. Из рис.9 также следует, что токсичность экстракта напрямую связана с количеством синтезируемого в ткани шиконина.

Изучение **антиоксидантной активности** экстрактов каллусных тканей оносмы, выращенных на различных питательных средах, показало, что при концентрации экстракта 1000 $\mu\text{г/мл}$ наибольшая активность наблюдалась у ткани, выращенной на питательных средах 3 и 2 после 20 пассажа ($97,42 \pm 0,16$ и $92,37 \pm 0,48$) (табл.2).

Таблица 2.

Антиоксидантная активность экстрактов *O. sericeum*

Питательная среда и пассаж	Концентрация (мкг/мл)	Ингибирование DPPH, %
1 (10)	1000	50.47 \pm 0.47 ^a
	2000	63.04 \pm 0.90 ^c
	3000	73.80 \pm 0.63 ^g
1 (20)	1000	65.42 \pm 0.70 ^{cd}
	2000	80.94 \pm 1.85 ^{hi}
	3000	89.09 \pm 0.28 ^k
2 (20)	1000	55.71 \pm 0.82 ^b
	2000	68.42 \pm 1.60 ^e
	3000	79.18 \pm 1.17 ^h
2 (20)	1000	92.37 \pm 0.48 ^l
	2000	93.85 \pm 0.50 ^{lm}
	3000	95.06 \pm 0.04 ^{mn}
3 (10)	1000	63.83 \pm 1.28 ^c
	2000	82.04 \pm 0.67 ⁱ
	3000	85.71 \pm 0.82 ^j
3 (20)	1000	97.42 \pm 0.16 ^{no}
	2000	98.09 \pm 0.04 ^o
	3000	98.52 \pm 0.05 ^o
Корни	1000	49.99 \pm 0.82 ^a
	2000	66.66 \pm 1.26 ^{de}
	3000	71.23 \pm 0.66 ^f

Экстракт каллусной ткани, выращенной на питательной среде 1 с ИУК, обладал слабой антиоксидантной активностью при концентрации 1000 мкг/мл независимо от возраста культуры. Но с повышением концентрации экстракта активность его увеличивалась. Корни интактного растения также проявили слабую активность. Поскольку у галловой кислоты (контроль) в данном опыте ингибирующая концентрация (IC_{50}) против DPPH радикала была 15 мкг/мл, следовательно исследуемые нами экстракты обладали слабой антиоксидантной активностью.

Антибактериальную активность метанольных экстрактов каллусов, выращенных на средах различного состава, и корня оносмы определяли методом диффузии экстракта в агар и измерением диаметра зоны ингибирования роста тест-объекта. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что все метанольные экстракты каллусных тканей, независимо от возраста культуры, и корня растения сильно ингибируют рост *Staphylococcus aureus*. *Bacillus subtilis* избирательно реагировал на экстракты – только экстракты каллусов, выращенных на среде 1, независимо от возраста, и на среде 3, 20-го пассажа, оказали значительное ингибирующее влияние на *B. subtilis*. На тестируемые грамотрицательные бактерии – *Escherichia coli* и *Salmonella typhi* – ни один из экстрактов не повлиял. Что касается влияния экстрактов на грибы, то оказалось, что ни один из тестируемых экстрактов не обладал антигрибковой активностью против *Aspergillus niger*. А каллусные ткани, выращенные на средах 1 и 2, независимо от возраста синтезировали вещества, подавляющие рост *Candida albicans*.

Таблица 3.

Антимикробная активность экстрактов *O. sericeum*

Экстракты 100 мг/мл	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
1 (10)	8	20	0	0	8	0
1 (20)	9	20	0	0	10	0
2 (20)	0	20	0	0	7	0
2 (20)	0	25	0	0	12	0
3 (10)	0	19	0	0	0	0
3 (20)	7	22	0	0	0	0
Корни	0	30	0	0	12	0

Примечание: состав сред

1 – MS(без NH_4) + KH_2PO_4 + 3 мг/л ВАР + 0,5 мг/л ИУК

2 - MS(без NH_4) + KH_2PO_4 + 3 мг/л ВАР + 0,5 мг/л ИУК

3 - MS(без NH_4) + NaH_2PO_4 + 3 мг/л ВАР + 0,5 мг/л ИУК

ВЫВОДЫ

1. Получены изолированные культуры трех лекарственных растений флоры Ирана - *Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri*, *Onosma sericeum*, растущие в перевиваемой культуре и обладающие способностью к образованию продуктов вторичного метаболизма.
2. Метанольные экстракты изолированной культуры *A. aucheri* проявляли цитотоксический эффект против *Artemia franciscana* в концентрации 1000 мкг/мл, но не обладали значительной антиоксидантной и антимикробной активностью даже при более высоких концентрациях.
3. Экстракт каллусной ткани *A. aucheri*, выращенной на среде с БАП и НУК, обладал высокой цитотоксичностью, а экстракт каллуса, растущего на среде с кинетином, ИУК, 2,4-Д, не проявлял цитотоксического действия. Следовательно, в изолированной культуре *A. aucheri* синтез продуктов вторичного метаболизма находится под гормональным контролем.
4. Синтезу шиконина в каллусной ткани *O. sericeum* способствовало исключение из питательной среды ионов аммония. И на этом фоне проявлялась регулирующая роль гормональных факторов среды.
5. Образование шиконина в каллусной ткани *O. sericeum* на питательной среде МС (без аммония), содержащей БАП (3 мг/л) в комбинации с НУК (0,5 мг/л) было в 3.2 раза выше, чем на среде, содержащей БАП с ИУК (0,5 мг/л).
6. Содержание шиконина в каллусной ткани *O. sericeum* составляло 130 мкг/г сухого веса, что в 11,3 раза выше, чем в корнях интактного растения.
7. Из всех исследованных экстрактов каллусов *O. sericeum* значительное токсическое действие против креветок ($LC_{50} < 1000$ мкг/мл) проявили только экстракты тканей, выращенных на среде МС (без аммония) с БАП и НУК с высоким содержанием шиконина и после 20 пассажа культивирования.
8. Антиоксидантная активность экстрактов исследуемых каллусных тканей *O. sericeum* тесно связана с содержанием в них шиконина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. S. Gharehmatrossian, M. Ghorbanli, Yu. Popov. Seed germination of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. // Materials of the International conference "Actual problems of Botany in Armenia", Yerevan, Armenia, 6-9 October, 2008, pp. 286-289.
2. S. Gharehmatrossian. *In vitro* cultivation of colocynth [*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad]. // Word congress on *in vitro* biology abstract. In Vitro Cell. Dev. Biol., 2008. P.-2068
3. S. Gharehmatrossian, Yu. Popov, M. Ghorbanli, Sh. Safaeian. Antioxidant activities and cytotoxic effects of whole plant and isolated culture of *Artemisia aucheri* Boiss. // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2012, Vol 5, Issue 4, pp. 95-98.

4. S. Gharehmatrossian, Yu. Popov, M. Ghorbanli. Seed germination, dormancy breaking techniques of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. plant // Iranian Journal of Plant Physiology. 2014, Vol 4, No 4, pp. 1167-1171.
5. S. Gharehmatrossian, Yu. Popov, M. Ghorbanli, Sh. Safaeian. *In-vitro* culture of *Artemisia aucheri* Boiss on four different tissue culture media for comparative cytotoxic effects and growth. //Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2014, Vol 7, Suppl 1, pp. 27-31.
6. S. Gharehmatrossian. Evaluation of callus induction and plant regeneration in *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. // Iranian Journal of Plant Physiology. 2015, Vol 5, No 2, pp. 1333-1338.

Ղարեհ-Մատրոսայան Սորմեհ Սերգիսի

ԻՐԱՆԻ ՖԼՈՐԱՅԻ *CITRULLUS COLOCYNTHIS* (L.) SCHARD., *ARTEMISIA AUCHERI* BOISS. ԵՎ *ONOSMA SERICEUM* WILLD. ՄԵԿՈՒՍՏՅԱՏ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՐԿՐՈՐԴԱՅԻ ԱՐԳԱՄԻՔՆԵՐԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՈՐՈՇ ՀՍԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ամփոփագիր

Բանալի բաներ. կալուսային կուլտուրա, *Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri*, *Onosma sericeum*, երկրորդային մետաբոլիտներ, շիկոնին:

In vitro պայմաններում բուսական հյուսվածքների և բջիջների աճեցումը հնարավորություն է տալիս ստանալու արժեքավոր մետաբոլիտներ՝ անկախ բույսի աճեցման վայրից, տարվա եղանակից, դրանով ստեղծում լրացուցիչ ռեսուրսային հիմք՝ սննդային, բժշկական և կոսմետիկ արտադրությունների համար: Ուստի, աճեցվող բուսական բջիջների երկրորդային նյութափոխանակության ուսումնասիրությունը արդիական է: Հաշվի առնելով բնական ռեսուրսների շարունակական նվազումը, ինչպես նաև մի շարք էկոլոգիական խնդիրներ (հողի աղտոտվածությունը ռադիոնուկլիդներով, պեստիցիդներով, նավթանյութերով) անհրաժեշտություն է առաջանում վայրի պայմաններում աճող բուսատեսակների փոխարինման՝ արտադրական ճանապարհով ստացվող և անհրաժեշտ միացություններ պարունակող հյուսվածքային կուլտուրաներով:

Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն էր երեք տեսակի դեղաբույսերի (*Citrullus colocynthis*, *Artemisia aucheri*, *Onosma sericeum*) մեկուսացված հյուսվածքների ստացումը, *in vitro* պայմաններում աճեցվող հյուսվածքների կենսաքիմիական պոտենցիալի արդյունավետ օգտագործման եղանակների մշակումը և գործնական արժեք ունեցող էկոլոգիապես մաքուր հումքի կենսատեխնոլոգիական աղբյուրի ստացումը:

Դառնադղմի (*C. colocynthis*) և օշինդրի (*A. aucheri*) կալուսային հյուսվածքները ստացվել են վայրի բույսերի ծլեցված սերմերից՝ աճեցնելով *in vitro* պայմաններում: Իշհոտոտի (*O. sericeum*) կալուսային հյուսվածքը ստացվել է ինտակտ բույսերի տերևներից:

Դառնադղմի սերմերի հանգստի շրջանը խախտելու համար օգտագործվել է գիբերելինային թթու (A_3): Սերմերի ծլման ամենաբարձր տոկոս նկատվել է 10 մգ/լ AQ-ի դեպքում: Կալուսային կուլտուրան ստացվել է տարբեր էքսպլանտներից: Սակայն հաջորդական փոխացանքերը հանգեցրել են կալուսի աճի ճնշման, իսկ 9-րդ փոխացանքից սկսած՝ դադարել է: Այդ պատճառով իրականացվել է կալուսային հյուսվածքներում օրգանոգենեզի խթանման և դառնադղմի միկրոկլոնային բազմացման աշխատանքներ: Օգտագործված սննդամիջավայրերից ադվենտիվ ցողունների ձևավորման համար առավել նպաստավոր է եղել 1-ական մգ/լ կինետին և ԻՔԹ պարունակող Մուրասիգեի-Սկուգի (ՄՍ) (1962) սննդամիջավայրը: Ռիզոգենեզի խթանման համար կինետինը հետացվել է սննդամիջավայրից: Արմատակալված բույսերը հետագայում տեղափոխվել են սուբստրատ:

Օշինդրի կալուսային կուլտուրան ստացվել են փորձարկված բոլոր սննդամիջավայրերի վրա: Սակայն, կախված սննդամիջավայրում հորմոնների կազմից, հյուսվածքներում ձևաբանական և աճի բնույթի տարբերություններ են նկատվել: Ուսումնասիրվել է կալուսի աճի ընթացքում հյուսվածքներում չոր նյութի տոկոսային պարունակությունը ըստ կուլտիվացման օրերի:

Ստուգվել է 3 մգ/լ ԲԱՊ և 0.5 մգ/լ ՆՔԹ պարունակող ՄՍ սննդամիջավայրում աճեցված օշինդրի կալուսային կուլտուրայի մեթանոլային լուծամզվածքի բջջատոքսիկությունը: Պարզվել է, որ 5 և 10 փոխացանքերի հյուսվածքները բջջատոքսիկ նյութ չեն սիթեզում: Սակայն, կալուսային կուլտուրայի երկարատև աճեցումը բերում էր վերջիններիս սինթեզին: Այսպես, 15-իդ փոխացանքից հետո լուծամզվածքի բջջատոքսիկությունը կազմել է $LC_{50} < 2000$ մկգ/լ, իսկ 20-րդ փոխացանքից հետո՝ $LC_{50} < 1000$ մկգ/լ: Սննդամիջավայրում ԲԱՊ-ի և ՆՔԹ-ի կոնցենտրացիաների նվազումը, ինչպես նաև հորմոնային խթանիչների (կինետին, ԻՔԹ, 2,4-Դ) օգտագործումը բերել է լուծամզվածքի բջջատոքսիկության նվազման կամ նույնիսկ բացակայության: Հետևաբար օշինդրի կալուսային կուլտուրայում երկրորդային արգասիքների սինթեզը խիստ կախված է հորմոնների բաղադրությունից և կազմից:

Օշինդրի մեթանոլային լուծամզվածքի հակօքսիդանտային ակտիվության ուսումնասիրությունը ցույց է տվել DPPH ռադիկալների նկատմամբ թույլ ճնշող ազդեցություն:

Օշինդրի և՛ ինտակտ բույսի, և՛ կալուսային հյուսվածքների մեթանոլային լուծամզվածքները հակամանրէային ակտիվություն չեն դրսևորել:

Փորձարկված 14 սննդամիջավայրերից իշհոտոտի կալուսային հյուսվածքների պրոլիֆերացիա նկատվել է միայն 5 սննդամիջավայրերում: Եվ կախված սննդամիջավայրի բաղադրությունից, կալուսները տարբերվել են

գույնով և կոնսիստենցիայով: Հետագա ուսումնասիրությունների համար ընտրվել են կարմրա-դարչնագույն կալուսային հյուսվածքները: ԲԱՀՔ մեթոդով հաստատվել է իշոտոտի կալուսային հյուսվածքներում շիկոնինների պարունակությունը, որով էլ պայմանավորվում է վերջինիս կարմիր գունավորումը:

Ուսումնասիրվել է իշոտոտի կալուսային հյուսվածքի աճի դինամիկան և չոր նյութի տոկոսային պարունակությունը ըստ կուլտիվացման օրերի: Աճեցման տևողությունը կազմել է 39-40 օր, որի ընթացքում կալուսային հյուսվածքում տեղի է ունենում գունանյութի կուտակում:

Նկատվել է սննդամիջավայրի կազմի ազդեցությունը իշոտոտի կալուսային հյուսվածքների աճի և պիզմենտի սինթեզի վրա: Հաստատվել է, որ սննդամիջավայրում ամոնիումի իոնների առկայությունը, ՆՔԹ-ի և ԻՔԹ-ի պարունակությունից անկախ խթանում է կալուսի աճը, սակայն այս դեպքում շիկոնինի սինթեզ տեղի չի ունենում: Մսնդամիջավայրում ամոնիումի հեռացումը բերում է շիկոնինների սինթեզին: Այս դեպքում, նկատվել է շիկոնինի սինթեզում ԻՔԹ-ի կարգավորող դերը: Այսպես, սննդամիջավայրում ԻՔԹ-ի պարունակության դեպքում չոր նյութում սինթեզված շիկոնինի քանակությունը կազմել է 9.85 մգ/լ: ԻՔԹ-ի փոխարինումը ՆՔԹ-ով խթանել է շիկոնինի սինթեզը (մինչև 15.26 մգ/լ շիկոնին չոր նյութում): Իսկ եթե սննդամիջավայրում KH_2PO_4 -ը փոխարինվում է NaH_2PO_4 –ով ապա սինթեզված շիկոնինի քանակությունը կազմում է 27.71 մգ/լ չոր նյութում: Նույն սննդամիջավայրում 20 օրեկան կուլտուրայում շիկոնինի քանակությունը չոր նյութում կազմել է 130.1 մգ/լ, որը ինտակտ բույսի արմատներում պարունակվող քանակությունից 11.5 անգամ ավել է: Լույսը ևս ունեցել է ազդեցություն իշոտոտի կուլտուրայում պիզմենտի առաջացման վրա:

Առավել բարձր բջջատոքսիկություն ունեցել են առանց ամոնիումի և ԻՔԹ պարունակող ՄՄ սննդամիջավայրում աճեցված կուլտուրաների լուծամզվածքները: Այդ դեպքում կուլտուրայի տարիքի մեծացման հետ (20-րդ փոհացանք) մեծացնում է լուծամզվածքի բջջատոքսիկությունը 2.5-3 անգամ: Հարկ է նշել, որ լուծամզվածքի տոքսիկությունը կախված է շիկոնինների պարունակությունից:

Իշոտոտի ուսումնասիրված բոլոր կալուսային հյուսվածքները բնորոշվել են թույլ հակամանրէային ակտիվությամբ:

Կալուսային լուծամզվածքների հակամանրէային ակտիվության ուսումնասիրությունները պարզել են, որ բոլոր մեթանոլային լուծամզվածքները, անկախ կալուսի տարիքից, ճնշել են *Staphylococcus aureus*-ի աճը, իսկ *Bacillus subtilis*-ի վրա ազդեցությունը ընտրողաբար էր: Գրամ բացասական մանրէներից *Escherichia coli* և *Salmonella typhi* –ի, ինչպես նաև *Aspergillus niger*-ի նկատմամբ հակամանրէային ազդեցություն չի նկատվել: Սակայն միայն KH_2PO_4 պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված կալուսային հյուսվածքների լուծամզվածքները ճնշում էին *Candida albicans*-ի աճը:

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF SECONDARY METABOLITES IN ISOLATED CULTURES OF *CITRULLUS COLOCYNTHIS* (L) SCHARD., *ARTEMISIA AUCHERI* BOISS AND *ONOSMA SERICEUM* WILLD. OF IRANIAN FLORA

Summary

Key words: *callus culture, Citrullus colocynthis, Artemisia aucheri, Onosma sericeum, secondary metabolites, shikonin.*

The cultivation of plant tissues and cells in condition *in vitro* gives the possibility of receiving the value metabolites independently of the place of their growth and the time of the year, i.e. to create an additional source of raw materials for food, medicinal and cosmetic industries. Taking into account the continuous decreasing of natural reserves as well as some ecological problems (pollution of the soil with radionuclids, pesticides and oil-products) it becomes evident the necessity of the substitution of wild raw materials by the received by industrial way biomass containing the necessary substances.

The goal of carried out investigations is the obtaining of isolated tissues of three species of medicinal plants (*Citrullus colocynthis, Artemisia aucheri, Onosma sericeum*) and the working out of methods for the effective realization of biochemical potentials of cultivated tissues in the *in vitro* system and obtaining the biotechnological source of ecologically pure raw materials with the practical value.

Callus tissues of colocynth and wormwood were received from the parts of plants grown from the sterile germinated seeds in conditions *in vitro*. Callus tissue of onosma was received from the leaves of intact plant.

The gibberellic acid (A_3) was used for breaking the rest of colocynth's seeds. The greatest rate of germination was obtained at the A_3 concentration 10 mg/l. Callus tissue of colocynth was obtain from different explants. However in subsequent passages the growth of callus was slowed down and to the 9-th passage was stopped. Therefore the work was carried out for induction of the organogenesis in callus tissue and clonal micropropagation of colocynth. Among all tested media the best one for the formation of adventive shoots was Mourashige-Skoog media (MS) (1962), which contained 1 mg/l kinetin and IAA. For induction of rhizogenesis the kinetin was removed from nutritional medium. The deep rooted plants later on were transferred in the substrate.

The callus culture of the wormwood was obtained on all tested media. However depending of hormonal composition of the medium we could see the differences in the tissue morphology and in the character of its growth. The dynamics of accumulation of the crude mass of tissue as well as the percentage content of dry substance at the each day of cultivation were studied.

Cytotoxicity of methanol extracts of the callus tissue of the wormwood grown on the nutrient medium MS with 3 mg/l BAP and 0,5 mg/l NAA was checked. It turned out that tissues of 5-th and 10-th passages did not synthesize the substances with cytotoxic activity. However with the increasing of the time of cultivation the callus tissue began to synthesize these combinations. So, after 15-th passage the toxicity of the extract constituted $LC_{50} < 2000$

µg/ml, and after 20th passage – LC₅₀ < 1000 µg/ml. The decrease of the concentration of BAP and NAA in the nutrient medium, as well as using the other hormonal effectors (kinetin, IAA, 2-4D) resulted in decreasing of cytotoxic effect of extract and even in its absence. Therefore the synthesis of the secondary products in the callus tissue of wormwood was under strict hormonal control.

Determination of the antioxidant activity of methanol extract of the wormwood showed the poor inhibitory activity against DPPH radicals.

Both the methanol extract of the intact plant and the callus tissues of the wormwood did not have antimicrobial activity.

Among 14 tested nutritious media the proliferation of onosma callus tissue was shown only on 5 media. The calli differed from each other both by the color and by the consistency, depending on the composition of nutritious medium. For further investigations the callus tissue of red-brownish color was chosen. In the callus tissue of onosma it was established by the method of HPLC the presence of shikonin.

The dynamics of the growth of callus tissue of onosma and the rate content of dry substance for each day of cultivation were studied. The duration of the passage was 39-40 days, and to this time the accumulation of pigments in the callus tissue took place. It turned out, that the presence of ammonium ions in the nutritious medium, independently of the presence in the medium NAA or IAA, promoted the callus growth, however the synthesis of shikonin did not take place. Removing the ammonium from the medium promoted the synthesis of shikonin. In this case the regulatory role of NAA in the synthesis of shikonin was noticed. So, in the presence of IAA the quantity of synthesized shikonin was 9,85 mg/g of dry weight. Substitution of IAA for NAA increased the synthesis of shikonin to 15,26 mg/g of dry weight. If at the same time instead of KH₂PO₄ was added NaH₂O₄ the quantity of synthesized shikonin grew to 27,71 mg/g of dry weight. With the increasing of the total age of culture (20-th passage) the synthesis of shikonin on this medium intensified and reached 130,1 mg/g of dry weight, i.e. for 11,5 times more than in the roots of intact plant, where its quantity was 11,5 µg/ml.

The light was the factor which determined too the formation of pigment in the onosma culture.

In the experiments for the determination of the effect of cytotoxicity it was found that the extract of tissue, grown on the MS medium without ammonium ions but with NAA, had the greatest cytotoxicity. With the increasing of the total age of culture (20-th passage) the extract toxicity was increased for 2,5-3 times. It is necessary to notice that the extract toxicity is straightly connected with the quantity of the shikonin synthesized in tissue.

All tested extracts from the callus tissues of onosma had weak antioxidant activity.

Results of the determination of antibacterial activity of extracts of calli, grown on the media of different composition, showed, that all methanol extracts, irrespectively of the culture age, inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. *Bacillus subtilis* selectively responded to extracts. As to the gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, none of the extracts influenced. None of the tested extracts had activity against the fungus *Aspergillus niger*. And only the extracts of the calli, grown on the medium with KH₂PO₄, inhibited the growth of *Candida albicans*.