

ПЧЕЛОВСЬКА С. А.[✉], ЛІТВИНОВ С. В., ШИЛНА Ю. В., ЖУК В. В., ЛИСТВАН К. В., САЛІВОН А. Г., ТОНКАЛЬ Л. В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: svetapchel@gmail.com

[✉] svetapchel@gmail.com, (044) 257-82-44, (098) 812-92-89

РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ ВМІСТУ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ФІТОСИРОВИНІ ШАВЛІЇ ЛІКАРСЬКОЇ ТА РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ

Мета. Багаторічні дослідження впливу сублетальних доз передпосівного рідкоіонізуючого опромінення насіння продемонстрували ефективність радіаційної біотехнології стимуляції накопичення фармацевтично цінних вторинних метаболітів у лікарській сировині багатьох поширених в Україні лікарських рослин. Метою пропонованої роботи була оцінка ефективності названої технології щодо насіння шавлії лікарської (*Salvia officinalis* L.) та розторопші плямистої (*Silybum marianum* L.). **Методи.** Використовували рентгенівське передпосівне опромінення насіння у дозах до 50 Гр, спектрофотометричний аналіз водно-етанольних екстрактів, флуоресцентну мікроскопію епідермісу листків. **Результати.** Визначено дози передпосівного рідкоіонізуючого опромінення насіння, що максимально стимулюють як приріст біомаси лікарської сировини, так і накопичення у ній вторинних метаболітів. Зокрема, для шавлії лікарської такими дозами є 5 Гр, 20 Гр, для розторопші плямистої – 10 Гр та 20 Гр. **Висновки.** Рекомендовано використовувати одночасно дві стимулюючі дози, оскільки результат впливу суттєвим чином залежить від фізіологічного стану насіння, умов вирощування, сортових особливостей. З'ясовано, що підвищення вмісту флавоноїдів і фенолів у лікарській сировині є надійним та відтворюваним маркером стимуляції накопичення розмаринової кислоти у листі шавлії лікарської.

Ключові слова: радіаційно-індукована стимуляція, *Salvia officinalis*, *Silybum marianum*, розмаринова кислота, силібінін.

Питання модифікації процесів вторинного метаболізму в лікарських рослинах за дії іонізуючого опромінення є актуальним і перспективним з огляду на зручність використання як технології передпосівного рідкоіонізуючого опромінення насіння лікарських рослин у дозах,

які стимулюватимуть приріст їх біомаси та фармацевтичної цінності. В ході попередніх досліджень було продемонстровано та завдяки повторностям доведено стимулюючий вплив певних доз передпосівного рідкоіонізуючого опромінення насіння низки лікарських рослин на вихід речовин фенольної природи у водно-етанольні екстракти [1–3]. Далі, в інтервалі сублетальних доз передпосівного опромінення, які стимулювали підвищений вихід вторинних метаболітів, підбирали дози, що не знижують або підвищують приріст біомаси лікарської сировини (ЛС) за різних умов культивування лікарських рослин. На основі результатів проведених експериментів було запропоновано радіаційну біотехнологію підвищення вмісту фармацевтично цінних речовин (фенолів та флавоноїдів) у водно-етанольних екстрактах із ЛС ромашки лікарської та звіробою продірявленого, що полягає в передпосівному опроміненні насіння цих рослин [4]. У пропонованій роботі представлено результати дослідження впливу експериментально підібраних доз рідкоіонізуючого опромінення насіння шавлії лікарської та розторопші плямистої на вміст у лікарській сировині фенолів, флавоноїдів, розмаринової кислоти та силібініну.

Матеріали і методи

Екстракцію суми флавоноїдів та фенолів здійснювали мацерацією наважки подрібненого матеріалу 70 % етанолом у кількісному співвідношенні 1:100 за 24 еС протягом 72 год. Отриманий екстракт фільтрували через ватний фільтр, за необхідності доводили до початкового об'єму 70 % етанолом і центрифугували (6 т. о., 40 хв) [5].

Кількісну оцінку вмісту вторинних метаболітів в екстрактах з лікарської сировини визначали шляхом вимірювання оптичної густини комплексу флавоноїдів і хлориду алюмінію [6]

© ПЧЕЛОВСЬКА С. А., ЛІТВИНОВ С. В., ШИЛНА Ю. В., ЖУК В. В., ЛИСТВАН К. В., САЛІВОН А. Г., ТОНКАЛЬ Л. В.

на спектрофотометрі СФ-46. Для цього до 1 мл отриманого екстракту додавали 1 мл 2 % спиртового розчину хлориду алюмінію та 4 мл 70 % етанолу. Паралельно готували розчин порівняння, що містив 1 мл екстракту, 1 краплю оцтової кислоти та 5 мл 70 % етанолу. Внаслідок реакції утворюється комплекс флавоноїд-алюміній, що має жовте забарвлення, його оптична густина залежить від концентрації флавоноїдів. Вимірювали оптичну густина розчинів на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм проти розчину порівняння. Концентрацію суми флавоноїдів визначали за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від концентрації рутину та виражали в мг рутинового еквівалента на 1 г сухої маси. Вміст флавоноїдів обраховували за формулою: $C_f = C \cdot k / m$, де C_f – вміст флавоноїдів, мг рутинового еквівалента на грам сухої маси; C – вміст флавоноїдів за калібрувальною кривою, мг/мл; k – коефіцієнт розведення; m – маса наважки рослинного матеріалу, г.

Дослідження вмісту фенольних сполук у екстрактах здійснювали спектрофотометрично. Метод визначення розчинних поліфенолів заснований на реакції з реактивом Фоліна-Чокальтеу (солі фосфовольфрамів та фосфомолібденової кислот) [7]. У лужному середовищі ці солі за наявності фенолів відновлюються з утворенням синіх комплексів. Визначали оптичну густина розчину синього кольору за довжини хвилі 760 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти проби, що містить етанол замість екстракту та виражали у мг галлової кислоти за калібрувальним графіком на 1 г сухої маси.

Для визначення вмісту силібініну в шроті насіння дослідних рослин насіння розторопші (наважка 30 мг) подрібнювали та гомогенізували з піском, додавали 5 мл 96 % етанолу, та настоювали в термостаті протягом 6 годин за температури 80°C. Охолоджували, центрифугували 15 хв при 7000 об/хв. Від отриманого екстракту відбирали 0,1 мл і додавали 2,4 мл 96 % етанолу та вимірювали оптичну густина за довжини хвилі 289 нм проти чистого 96 % етанолу. Вміст флаволігнанів у перерахунку на силібінін у % визначали за формулою:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де D – оптична густина досліджуваного розчину; D_0 – оптична густина розчину стандарту (СО) силібініну (калібрівка за чистим силібініном); m – маса сировини, г; m_0 – маса СО силі-

бініну, г; W – втрата під час висушування, %.

Також було проведено мікроскопічне дослідження локалізації включень ефірних олій на прикладі листків рослин шавлії лікарської. Для мікроскопічного аналізу відбирали добре розвинуті, непошкоджені листки однакового розміру верхнього ярусу рослин шавлії лікарської третього року вегетації, вирощених в умовах відкритого ґрунту (дослідна ділянка на території ІФРГ НАН України). Безпосередньому вивченню підлягали сектори середньої частини листка епідермісу верхньої та нижньої поверхні листка. Дослідження епідермісу та включень ефірної олії проводили методом мікроскопії за довжин хвиль 360 нм і 461 нм за допомогою флуоресцентних мікроскопів Axiostar і Axioskop (Zeiss). Фотоматеріали виготовляли з використанням камери AxioCam MRc5 (Zeiss). Фотозображення обробляли, використовуючи програмне забезпечення AxioVisions Rel 4.7 (Carl Zeiss). Проводили підрахунок числа включень – крапель ефірної олії в полі зору. Усереднені дані підрахунку числа включень (для кожного варіанта – не менше ніж 10 секторів у трикратній повторності) аналізували для кожного року досліджень та за три послідовні роки. Зразки (листки) відбиралися з рослин, вирощених із неопроміненого та опроміненого насіння, у дозах 5, 10, 20, 35 та 50 Гр насіння.

Обробку даних здійснювали стандартними статистичними методами з використанням програмних засобів Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, США) та SPSS 17.0 (IBM, США).

Результати та обговорення

На рис. 1 представлена дозова залежність визначеного спектрофотометрично вмісту фенолів, флавоноїдів та розмаринової кислоти у водно-етанольних екстрактах із ЛС шавлії лікарської, вирощеної з насіння, яке піддавали дії передпосівного опромінення. Отримана залежність демонструє збільшення вмісту флавоноїдів та розмаринової кислоти в екстрактах за дії всіх доз опромінення насіння шавлії лікарської. Вміст фенольних сполук у водно-етанольних екстрактах із листків шавлії лікарської також перевищував контрольні значення, за винятком варіанта застосування передпосівного опромінення насіння в дозі 25 Гр.

Отримані результати мікроскопічних досліджень показують, що у листках рослин шавлії лікарської, вирощених із насіння, яке піддавали передпосівному опроміненню, спостерігається

збільшення кількості включень (краплинок) ефірної олії в порівнянні з контролем за всіх застосованих доз передпосівного опромінення насіння. Результати, усереднені за три роки, представлені в таблиці.

Найбільш відтворюване та суттєве збільшення кількості краплинок ефірної олії в листках шавлії виявлено для доз передпосівного рентгенівського опромінення насіння 5 Гр, 20 Гр та 50 Гр. За дії тих самих доз зростав і вміст розмаринової кислоти в екстрактах у перерахунку на одиницю маси лікарської сировини (що, в основному, співпадало із збільшенням вмісту у лікарській сировині флавоноїдів та фенолів). З урахуванням показника стимуляції збільшення біомаси загальний стимулюючий

вплив мали дози передпосівного опромінення 5 Гр та 20 Гр. Отже, можна очікувати збільшення загального виходу ефірної олії із листків рослин шавлії лікарської за умови застосування пропонуваного методу – передпосівного опромінення насіння рідкоіонізуючою радіацією у стимулюючих дозах.

Дозова залежність виходу розмаринової кислоти з ЛС шавлії лікарської корелювала зі зміною вмісту фенолів (r -Пірсона = 0,78, $P < 0,05$) і флавоноїдів (r -Пірсона = 0,79, $P < 0,05$). Отже, підвищення вмісту у сировині шавлії лікарської поліфенолів та флавоноїдів можна використовувати в якості маркера радіаційної стимуляції синтезу розмаринової кислоти.

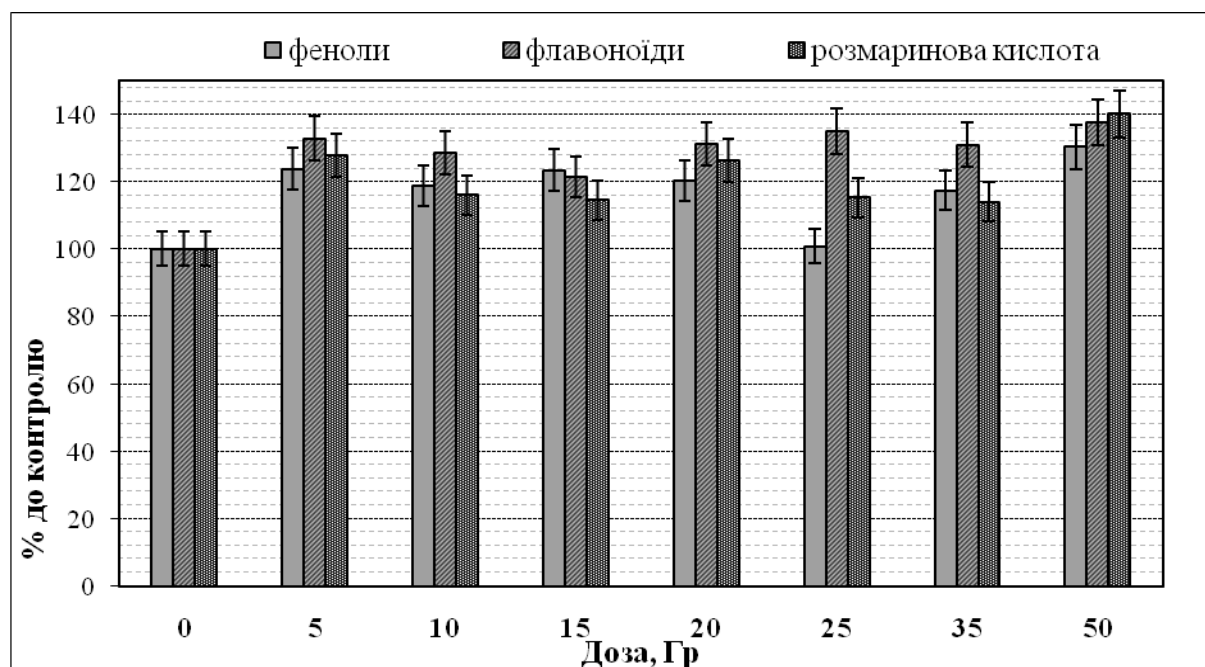


Рис. 1. Вміст фенолів, флавоноїдів та розмаринової кислоти у водно-етанольних екстрактах із листків шавлії лікарської, вирощеної з опроміненого насіння, % до контролю.

Таблиця. Кількість краплин ефірної олії в полі зору для листків шавлії лікарської, вирощеної з опроміненого та неопроміненого насіння, – усереднені результати досліджень за три послідовні роки (2017, 2018, 2019 рр.). Стандартна похибка не перевищувала 5 %

	Кількість краплин ефірної олії в полі зору	% до контролю
0 Гр (контроль)	14	100
5 Гр	16	114
10 Гр	15	105
20 Гр	17	124
35 Гр	15	107
50 Гр	16	114

Визначення вмісту силібінину у шроті насіння розторопші, вирощеної з опроміненого в дозовому інтервалі 5–25 Гр насіння, показало стимулюючий вплив доз 5 Гр, 10 Гр, 20 Гр (рис. 2). Водночас доза 5 Гр не є стимулюючою щодо збільшення маси лікарської сировини.

Таким чином, підсумовуючи усі отримані результати, можна рекомендувати використання для передпосівного опромінення розторопші плямистої доз рідкоіонізуючої радіації 10 Гр та 20 Гр, для шавлії лікарської – 5 Гр та 20 Гр.

Висновки

Спектрофотометричний аналіз вмісту суми флавоноїдів у перерахунку на рутин у водно-етанольних екстрактах із ЛС досліджуваних рослин залежно від дози передпосівного опромінення насіння за чотири послідовні роки дослідження дав підстави визначити дози, що стимулюють накопичення вторинних метаболітів: 5 Гр та 20

Гр – для шавлії лікарської і 10 Гр та 20 Гр – для розторопші плямистої. Ці ж дози є стимулюючими щодо виходу з лікарської сировини розмаринової кислоти (шавлія лікарська) та силібінину (розторопша плямиста). Доведено, що накопичення флавоноїдів можна використовувати як маркер радіаційної стимуляції підвищення виходу розмаринової кислоти з лікарської сировини шавлії лікарської.

Робота виконана та профінансована за рахунок державних коштів наукового проекту «Молекулярно-радіаційна біотехнологія підвищення фармакологічної ефективності лікарських рослин в культурі і природі», що виконувався в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», державний реєстраційний номер: 0115U001343.

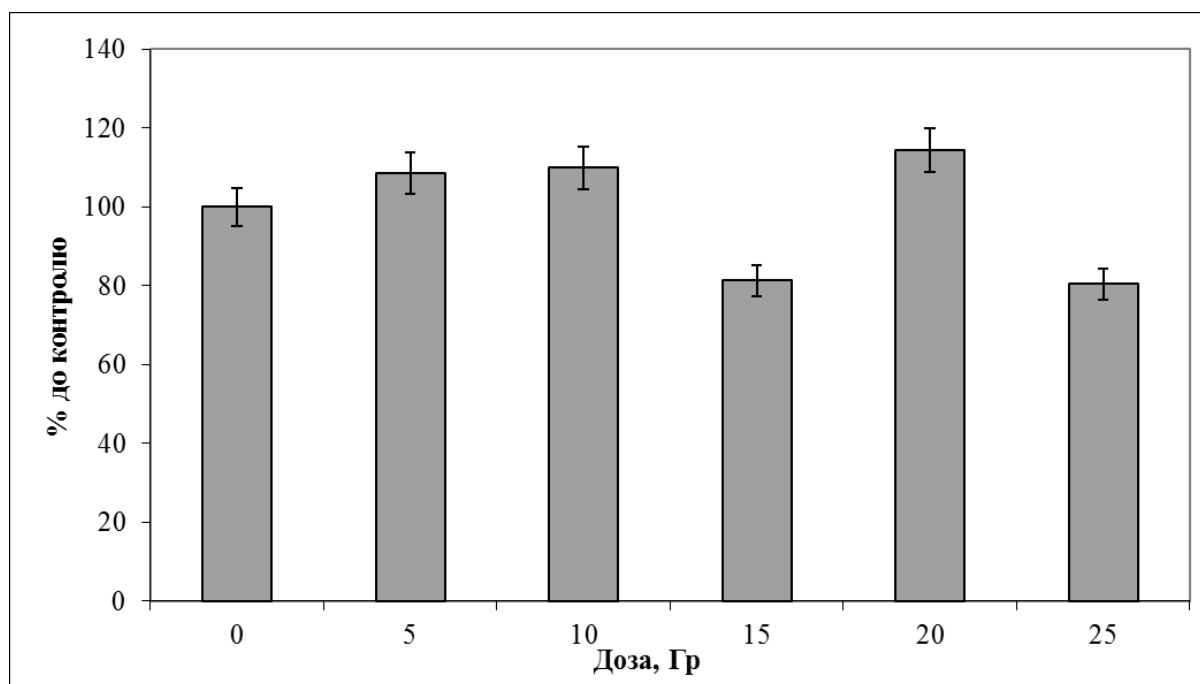


Рис. 2. Вміст силібінину у шроті насіння розторопші плямистої, вирощеної з опроміненого насіння, % до контролю.

References

1. Pchelovska S.A., Litvinov S.V., Shylina Yu.V., Lystvan K.V., Zhuk V.V., Sokolova D.O., Tonkal L.V., Salivon A.H., Nesterenko O.H. Vplyv передпосівного опромінення насіння ромашки лікарської на накопичення флавоноїдів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. пр. К.: Укр. Т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2018. Vol. 22. P. 311–317. [in Ukrainian] / Пчеловська С.А., Літвінов С.В., Шиліна Ю.В., Листван К.В., Жук В.В., Соколова Д.О., Тонкаль Л.В., Салівон А.Г., Нестеренко О.Г. Вплив передпосівного опромінення насіння ромашки лікарської на накопичення флавоноїдів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. пр. К.: Укр. Т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2018. Т. 22. С. 311–317. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.967>.
2. Salivon A.H., Lystvan K.V., Litvinov S.V., Pchelovska S.A., Shylina Yu.V., Zhuk V.V., Tonkal L.V. Vyznachennia vplyvu rıznykh doz передпосівного опромінення насіння на вміст флавоноїдів та фенолів у лікарській сировині з виробітку звичайного. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: збірник наукових праць. Київ, 2019. Vol. 25. P. 310–315. [in Ukrainian] / Са-

- лівон А.Г., Листван К.В., Літвінов С.В., Пчеловська С.А., Шиліна Ю.В., Жук В.В., Тонкаль Л.В. Визначення впливу різних доз передпосівного опромінення насіння на вміст флавоноїдів та фенолів у лікарській сировині звіробою звичайного. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: збірник наукових праць. К., 2019. Т. 25. С. 310–315. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1183>.
3. Lioshina L., Bulko O., Litvinov S., Pchelovska S., Sokolova D., Berestyayana A., Tonkal L., Salivon A. X-ray effects on stress response of the *Ri*-transformants *in vitro* *Digitalis purpurea* L. *Radiation&Applications*. 2017. 2 (1). P. 1–4. <https://doi.org/10.21175/RadJ.2017.01.001>.
 4. Pchelovska S.A., Shylina Yu.V., Lystvan K.V., Zhuk V.V., Sokolova D.O., Tonkal L.V., Salivon A.H., Nesterenko O.H. Патент на корисну модель «Спосіб підвищення вмісту флавоноїдів у сировині лікарських рослин шляхом передпосівної радіаційної обробки насіння» № 129749. [in Ukrainian] / Пчеловська С.А., Шиліна Ю.В., Листван К.В., Жук В.В., Соколова Д.О., Тонкаль Л.В., Салівон А.Г., Нестеренко О.Г. Патент на корисну модель «Спосіб підвищення вмісту флавоноїдів у сировині лікарських рослин шляхом передпосівної радіаційної обробки насіння» № 129749.
 5. Dai J., Mumper R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010. Vol. 15 (No. 10). P. 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
 6. Butnariu M., Coradini K. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chem Cent J*. 2012. Vol. 6. P. 35–40. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-35>.
 7. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B. et al. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic. *Food chemistry*. 2006. Vol. 97, No. 4. – P. 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.

PCHELOVSKA S.A., LITVINOV S.V., SHYLINA YU.V., ZHUK V.V., LYSTVAN K.V., SALIVON A.G., TONKAL L.V.

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

RADIATION-INDUCED MODIFICATION OF SECONDARY METABOLITES CONTENTS IN PLANTS OF *SALVIA OFFICINALIS* L. AND *SILYBUM MARIANUM* L.

Aim. Long-term studies of the effect of sublethal doses of pre-sowing low-LET ionizing radiation on seeds have demonstrated the effectiveness of radiation biotechnology to stimulate the accumulation of pharmaceutically valuable secondary metabolites in medicinal raw materials of a number of common medicinal plants in Ukraine. The aim of this research was to evaluate the effectiveness of radiation technology in the case of seeds of *Salvia officinalis* L. and *Silybum marianum* L. **Methods.** X-ray irradiation of seeds at doses up to 50 Gy, spectrophotometric analysis of water-ethanol extracts, fluorescence microscopy of leaf epidermis were used. **Results.** Doses of pre-sowing X-ray irradiation were selected which maximally stimulate both the increase of biomass of medicinal raw materials and the accumulation of secondary metabolites. In particular for *Salvia officinalis* L. doses are 5 Gy and 20 Gy, for *Silybum marianum* L. are 10 Gy and 20 Gy. **Conclusions.** It is recommended to use two stimulating doses at the same time, as the result of exposure depends essentially on the physiological status of the seeds, growing conditions, varietal characteristics. Increasing the content of flavonoids and phenols in medicinal raw materials has been shown to be a reliable and reproducible marker of stimulating of rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* leaves.

Keywords: radiation-induced stimulation, *Salvia officinalis*, *Silybum marianum*, rosmarinic acid, silibinin.