

for the growing of regenerants on the soil substrate. Obtaining the plantlets. **Results.** The main stages of biotechnology for obtaining of regenerates by the embryo culture *in vitro* have developed. The success of culture *in vitro* is completely determined by the stage of embryogenesis of the inoculated embryo. **Conclusions.** The biotechnology of obtaining of regenerants by the embryo culture *in vitro* has made at the first time. Such biotechnology should stably and valid obtaining the regenerants following the outline: one embryo – one regenerant.

Key words: *Oxytropis baschkirensis*, biotechnology, embryo culture *in vitro*.

КУЗОВКОВА А.А.¹, МАЗУР Т.В.¹, АЗИЗБЕКЯН С.Г.², РЕШЕТНИКОВ В.Н.¹

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

²ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 13, e-mail: mechanochem@ifoch.bas-net.by

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕЛЕНИТА НАТРИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО

Биологически активный микроэлемент селен (Se) эссенциален для одних организмов (бактерии, животные, люди) и благотворно влияет на другие (растения). В организме человека Se наряду с витаминами А, Е, и С считается одним из главных компонентов неферментативного пути антиоксидантно-антирадикальной защитной системы. Недостаточная обеспеченность организма селеном связана с этиологией многих, в том числе сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Другая важная роль Se заключается в антагонизме с тяжелыми металлами, и в ряде работ показано протекторное значение Se при накоплении в организме кадмия и ртути [1]. Во многих географических регионах (и в Беларуси) регистрируются дефицитные обеспеченности йодом и селеном, сочетающиеся друг с другом. Дефицит Se усугубляет проявления йодной недостаточности, вызывая не только тиреоидную дисфункцию, но и индуцирует некротические, фиброзные изменения в щитовидной железе, стимулирует клеточную пролиферацию [2]. В ближайшие годы содержание Se в почве будет неуклонно падать, что связано с повсеместным уменьшением содержания гумуса, закислением и загрязнением тяжёлыми металлами. Для регионов с недостатком Se в окружающей среде ВОЗ установил норму физиологического потребления от 50 до 200 мкг Se в сутки [3], для достижения которой необходима коррекция питания. В источниках питания Se находится в двухвалентной органической форме, причем в животных продуктах преобладает селеноцистеин, а в растительных — селенометионин. Одним из способов коррекции уровня

Se в продуктах питания является использование селенообогащенной кормовой базы для скота и птиц [4], а также повседневный лечебно-профилактический прием биологически активных добавок (БАД) к пище. БАД с Se могут использоваться как нутрицевтики (для восполнения Se в организме) и парафармацевтики (с фармакологической активностью для регуляции отдельных функций организма и вспомогательной терапии заболеваний). Некоторые лекарственные растения-металлофиты накапливают Se и могут использоваться как БАД. В частности, фитопрепарат Setarud, состоящий из экстрактов Se-богатых растений пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), шиповника собачьего (*Rosa canina* L.) и крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), применяют как иммуномодулятор в комплексной терапии вирусных болезней, в том числе и ВИЧ [5,6].

В составе удобрений, добавок в корма и в ветеринарных препаратах, как правило, используют высокотоксичный (1 класс опасности) селенит (Se^{4+}) [7]. В последнее время в странах СНГ и за рубежом ведется поиск заменяющих селениты веществ, и поэтому проявляется повышенный интерес к медико-биологическим свойствам наночастиц нульвалентного Se (наноSe). Показано [8], что стабилизированные белком наночастицы Se с размерами 20–60 нм полностью сохраняют спектр биологической активности ионного Se, в частности, стимулируют синтез Se-содержащих ферментов, но при этом в несколько раз менее токсичны, чем селенит натрия. Применение препарата наноSe активировало систему антиоксидантной защиты ла-

бораторных мышей через повышение активностей каталазы и пероксидазы, способствовало уменьшению образования продуктов перекисного окисления липидов, а также положительно влияло на прирост массы в животноводстве [9].

Нами исследовалось влияние препарата наноSe и селенита натрия на физиолого-биохимические показатели клеточных культур (калусов) лекарственного растения многоко-

Материалы и методы

Каллусы инициировали в темноте из листьев и стеблей асептических растений *A. rugosa* на твердой 1/2 среде Мурасига-Скууга (МС) с 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,1 мг/л – 6-бензиламинопурина (БАП). Каждые 15-16 дней каллусы пассировали на новую среду. Перед последним пассажем в среду МС добавляли 10 или 50 мг/л препарата наноSe или селенита натрия. Для анализов использовали листовую и стеблевую каллусы 14-го пассажа. Каллусы данного возраста относятся к длительнопассируемым, состоящим из полностью дедифференцированных клеток, образующих рыхлую массу. Экстракцию белков вели по [10] с

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах по определению среднесмертельной дозы (ЛД50) на лабораторных мышах установлено, что острая токсичность наноSe на порядок ниже, чем у препарата в виде раствора селенита натрия (рисунок 1). По результатам анализа крови мышей

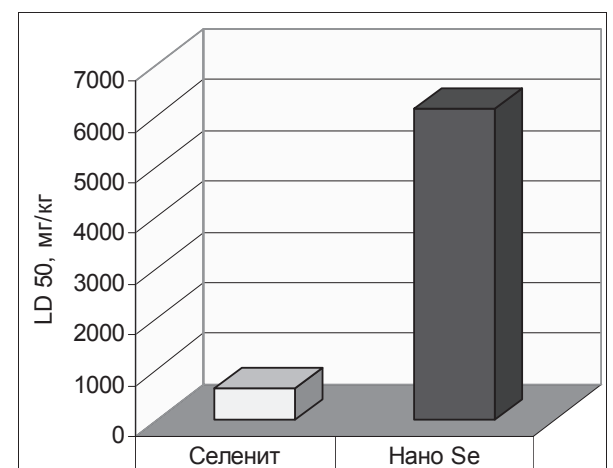


Рис. 1. Острая токсичность (ЛД50) селенита натрия и наноSe

лосник морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze): на способность поглощать Se из культуральной среды, содержание белка и активность пероксидазы. В перспективе на основе данных каллусов планируется получить суспензионные культуры, способные синтезировать ценные биологически активные вещества, или, возможно, использовать препарат клеток как самостоятельный БАД.

нашими модификациями, используя 37,5 мМ трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 5мМ аскорбата. Во всех экспериментах соотношение «навеска:буфер» было 1:3. Содержание белка определяли, используя набор реагентов «DC Protein Assay» (Bio-Rad, США). Активность пероксидаз оценивали по [11] и выражали в условных единицах на миллиграмм белка.

Препарат наноSe в виде стабилизированного коллоидного раствора наночастиц (35-60 нм) аморфного Se синтезирован в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

показано, что использование наноSe обеспечивает существенно большую активность селенсодержащего антиокислительного фермента глутатионпероксидазы в длительном интервале измерений (15 суток) после инъекций (рис. 2).

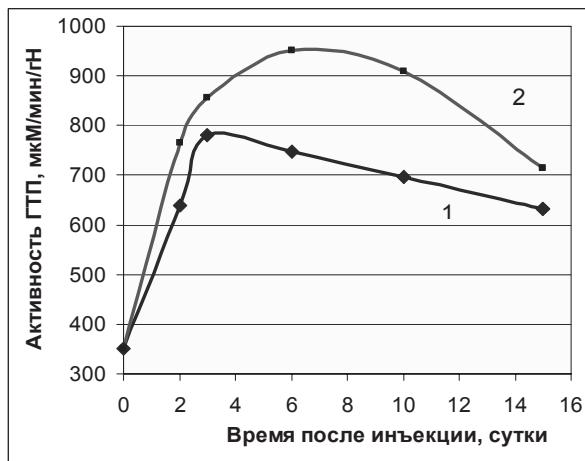


Рис. 2. Изменение активности глутатионпероксидазы при инъекции Se в виде Na_2SeO_3 (кривая 1) и наноSe (кривая 2)

В экспериментах с каллусами была подтверждена существенная разница в токсичности двух препаратов: листовые и стеблевые каллусы на средах и с 10, и 50 мг/л селенита натрия побурели и погибли, в то время как при использовании наноSe сохранили жизнеспособность.

Методом атомно-эмиссионной спектро-

метрии обнаружено (таблица 1), что используемые клетки стеблевого каллуса *A. rugosa* содержат довольно большое количество Se (36,5 ppm) — в 4 раза выше, чем в клетках листового каллуса и в 5 раз больше, чем, например, в растениях расторопши пятнистой [12].

Таблица 1. Поглощение наноSe и селенита натрия каллусами *A. rugosa*

Среда культивирования	Содержание Se, ppm (мкг/г сырой ткани)	
	Листовой каллус	Стеблевой каллус
Среда МС (контроль)	9,4	36,5
Среда МС с 10 мг/л наноSe	163,1	117,2
Среда МС с 50 мг/л наноSe	702,7	368,3
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	13656,7	22604,7
Среда МС с 50 мг/л селенита натрия	36748,3	40861,2

Степень поглощения наноSe, как листовым, так и стеблевым каллусом хоть и оказалась на два порядка ниже, чем для селенита натрия, но привела к заметному увеличению активности пероксидазы по сравнению с контролем для листового каллуса и меньшему подавлению активности фермента для стеблевого (таблица 2). Селенит натрия в исследуемых концентрациях

ингибировал активность пероксидазы на ~68–82% и в листовом, и в стеблевом каллусах. В исследованиях Храмцова и др. [9] также отмечается, что применение препарата наноSe активировало систему антиоксидантной защиты лабораторных мышей через повышение активностей каталазы на 15,2 и пероксидазы на 26,6 %.

Таблица 2. Влияние наноSe и селенита натрия на активность пероксидазы в каллусах *A. rugosa*

Среда культивирования	Листовой каллус		Стеблевой каллус	
	активность, у.е./ мг белка	%	активность, у.е./ мг белка	%
Среда МС (контроль)	23405,870 ±1234,574	100	11982,460 ±764,276	100
Среда МС с 10 мг/л наноSe	29151,110 ±2355,119	124,55	8978,786 ±335,355	74,93
Среда МС с 50 мг/л наноSe	27752,180 ±2717,647	118,57	9395,478 ±689,674	78,41
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	7409,591 ±619,240	31,66	3618,295 ±419,227	31,00
Среда МС 50 мг/л с селенита натрия	5226,586 ±549,151	22,33	2184,874 ±288,515	18,23

Se, накопленный каллусными клетками *A. rugosa*, стимулировал в них биосинтез белка. Как видно из таблицы 3, присутствие наноSe в культуральной среде в количестве 10 или 50 мг/л увеличило содержание белка в клетках листового каллуса на ~ 26 и 23%, а стеблевого — на ~ 33 и 43%, соответствен-

но. Селенит натрия, лучше поглощаемый клеточными культурами *A. rugosa*, в свою очередь сильнее индуцировал в них биосинтез белка, но, возможно, интенсивность данного процесса была чрезмерной, что могло явиться одной из причин гибели каллусных культур.

Таблица 3. Влияние наноSe и селенита натрия на содержание белка в каллусах *A. rugosa*

Среда культивирования	Листовой каллус		Стеблевой каллус	
	Содержание белка, мг/мл	%	Содержание белка, мг/мл	%
Среда МС (контроль)	1,057±0,119	100	1,520±0,088	100
Среда МС с 10 мг/л наноSe	1,339±0,144	126,68	2,027±0,035	133,36
Среда МС с 50 мг/л наноSe	1,302±0,073	123,18	2,167±0,029	142,57
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	1,696±0,146	160,45	2,784±0,146	183,16
Среда МС с 50 мг/л селенита натрия	1,324±0,091	125,26	1,666±0,049	109,61

Выводы

Таким образом, нами установлено, что каллусные клетки многоколосника морщинистого обладают выраженной металлофитной способностью по отношению к Se. При этом селенит натрия для клеток *A. rugosa* более биодоступен, чем наноSe, однако в высоких концентрациях он токсичен – приводит к гибели клеток.

Se, накапливаемый каллусными клетками *A. rugosa*, стимулирует в них биосинтез белка и модифицирует активность пероксидазы. Результаты предварительных экспериментов указывают, что на роль компонента БАД претендует исключительно наноSe как нетоксичный ни для животных, ни для растений препарат.

Литература

1. Громова О.А. Селен – впечатляющие итоги и перспективы применения // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5, №14. – С. 25–30.
2. Макаревич И.А. Исследование йод-дефицитных состояний у подростков загрязненных районов Брестской области // BFRIR-PINSK.ORG: официальный сайт Брестского филиала РНИУП «Институт радиологии». – 2005–URL: <http://www.bfrir-pinsk.org/docs/article/2005/004bf05.pdf>. – дата обращения 27.02.2012.
3. Жамсаранова С.Д. Селенсодержащая кормовая добавка // Молочная промышленность. – 2008. – №7. – С. 23.
4. Муроx В.И., Коломиец Н.Д. и др. Обогащение хлеба и хлебобулочных изделий селеном: методические рекомендации. – Минск: Минздрав Республики Беларусь, 2001. – 20 с.
5. Kheyrandish P., Mohraz M., Farzambar B., Shah H.M.H., Madani H., Sadeghi B.B. et.al. Preclinical and phase 1 clinical safety of Setarud (IMOD TM), a novel immunomodulator // DARU. – 2009. – Vol. 17, №3. – P. 148–156.
6. Shirazi F.G., Raoufi A., Yousefi M., Asgarian-Omran H., Memarian A., Khoshnoodi J., Younesi V., Shokri F. In vitro immunoinhibitory effects of Setarud on human B lymphocyte // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5, №11. – P. 2223–2231.
7. Голубкина Н.А., Папазян Т.Т. Селен в питании. Растения, животные, человек. – М.: Печатный город, 2006. – 254 с.
8. Zhang J.-S. Biological effects of nano red elemental selenium // BioFactors. – 2001. – Vol. 15. – P. 27–38.
9. Храпцов А.Г., Серов А.В., Тимченко В.П., Мирошниченко М.В. Новый биологически активный препарат на основе наночастиц селена // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2010. – №4. – С. 122–125.
10. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений: сб. ст. / Под ред. Ю.Г. Молотковско-го. – М., 1971. – С.113–119.
11. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. / под ред. Б.А. Рубина. – М.: Высш. школа, 1975. – 392 с.
12. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases // SUN.ARS-GRIN.GOV: U.S. Department of Agriculture's Agricultural Research Service. – URL: <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=931>. – Date of access: 16.06.2012.

KUZOVKOVA A.A.¹, MAZUR T.V.¹, AZIZBEKIAN S.G.², RESHETNIKOV V.N.¹

¹SSI «Central Botanical Gardens», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 2B, e-mail: fioraia@nm.ru

²SSI «Institute of Physical Organic Chemistry», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 13, e-mail: mechanochem@ifoch.bas-net.by

BIOLOGICAL EFFECTS OF SELENIUM NANOPARTICLES AND SODIUM SELENITE ON *AGASTACHE RUGOSA* CELLULAR CULTURES

Aims. Recently search of substances replacing toxic selenites is conducted. The Se nanoparticles and sodium selenite influence on physiological and biochemical parameters of *A. rugosa* callus tissues were investigated.

Methods. Accumulation of Se in callus tissues were measured by nuclear and issue spectrometry. Protein content and peroxidase activity were measured by specific spectrometric methods. **Results.** It was found that *A. rugosa* callus tissues possessed the expressed ability to Se accumulation. Sodium selenite was more bioavailable for *A. rugosa* cells than Se nanoparticles, however it was toxic in investigating concentration (10 and 50 mg/l) and caused callus death. Selenium in *A. rugosa* callus tissues stimulated biosynthesis of protein and modified peroxidase activity. **Conclusions.** Only Se nanoparticles as nontoxic neither for animals, nor for plants apply for a role of the dietary supplement component.

Key words: *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, callus tissues, selenium nanoparticles, sodium selenite.

ЛЕМЕШ В.А.¹, ГУЗЕНКО Е.В.¹, САКОВИЧ В.И.¹, НИКОЛАЙЧИК Е.А.², ЕВТУШЕНКОВ А.Н.²

¹Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: e.guzenko@igc.bas-net.by

²Белорусский государственный университет

Минск, Беларусь

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.), НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ, МЕТОДАМИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Снижение засоренности посевов льна не может быть успешно решено без применения гербицидов. В республике Беларусь производится и используется для обработки посевов льна глифосатсодержащий гербицид «Белфосат». Данный препарат создан на основе системного гербицида сплошного действия – N-фосфометилглицина (C₃H₈NO₅P), эффективного против более 300 видов однолетних и многолетних однодольных и двудольных растений. Однако многократное опрыскивание растворами гербицидов негативно влияет на состояние посевов льна, а также приводит к накоплению остаточных количеств токсических веществ в семенах. Обеспечить эффективную и экономически выгодную защиту данной сельскохозяйственной культуры возможно с помощью технологий получения генетически модифицированных (ГМ) растений. Встраивание в геном организма хозяина генетических конструкций имеет целью получить новый признак, недостижимый для данного организма путем традиционной селекции.

К настоящему времени клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени, что дало возможность получить трансгенные растения устойчивые к глифосату [1, 2, 3, 4], хлорсульфурновым и имидазолиновым гербицидам [5, 6]. Изолированы также гены, кодирующие ферменты деградации некоторых гербицидов, что способствовало созданию линий с устойчивостью к фосфинотрицину [7], 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) [8], далапону [9].

Несмотря на то, что лен был в числе первых растений – объектов генной инженерии, в мире не существует коммерческих ГМ линий льна. Возможно, это связано с относительно слабой генетической изученностью льна, с ограниченностью информации о закономерностях органогенеза данной культуры, анатомическими и физиологическими особенностями растений-регенерантов, а также низкой эффективностью применяемых методов трансформации и вводимых генетических конструкций.

Целью работы являлось создание транс-