

УДК 582.623.2; 58.087

UDC 582.623.2; 58.087

**РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ  
СЕЛЕКЦИОННОЙ ОЦЕНКИ *SALIX  
ACUTIFOLIA* НА СОДЕРЖАНИЕ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

**DEVELOPMENT OF CRITERIA FOR  
SELECTION ESTIMATION OF *SALIX  
ACUTIFOLIA* FOR THE CONTENT OF  
BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES**

Большакова Екатерина Евгеньевна  
аспирант

Bolshakova Ekaterina Evgenievna  
postgraduate student

Шургин Алексей Иванович  
к.с.-х.н., доцент

Shurgin Aleksey Ivanovich  
Cand.Agr.Sci., associate professor

Сергеев Роман Владимирович  
к.с.-х.н., старший преподаватель

SergeevRomanVladimirovich  
Cand.Agr.Sci., senior lecturer

Новиков Петр Сергеевич  
аспирант

Novikov Petr Sergeevich  
postgraduate student

Шевелева Надежда Николаевна  
аспирант

Sheveleva Nadezhda Nikolaevna  
postgraduate student

Грунин Леонид Юрьевич  
к.х.н., доцент  
*Поволжский государственный технологический  
университет, Йошкар-Ола, Россия*

Grunin Leonid Jurievich  
Cand.Agr.Sci., associate professor  
*Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola,  
Russia*

Проведена селекционная оценка популяции Ивы остролистной. У изучаемых деревьев измерены следующие показатели: процентное содержание салицилатов, доля коры по отношению к древесине. По этим двум показателям вычислена комплексная продуктивность деревьев. На основе чего, деревьям присвоены селекционные категории: 1 категория: деревья с высокой продуктивностью - (49,7 – 39,9 кг/т сырья); 2 категория: деревья со средней продуктивностью – (39,1 – 33,8 кг/т сырья); 3 категория: деревья с низкой продуктивностью – (31,8 – 24,3 кг/т сырья)

In the article we have conducted the estimation of breeding population of *salix acutifolia*. We have studied the following indicators of the measured trees: the percentage of salicylates, bark content in relation to the wood. For these two indices we have calculated the "complex" productivity of the trees. Based on that, the trees are assigned to these breeding categories: Category 1: trees with high productivity - ( 49.7 - 39.9 kg / t of raw materials) Category 2 : trees with average productivity - ( 39.1 - 33.8 kg / m raw materials) category 3 : trees with low productivity - ( 31.8 - 24.3 kg / t of raw materials)

Ключевые слова: *SALIX ACUTIFOLIA*,  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА;  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ, СЕЛЕКЦИОННАЯ  
КАТЕГОРИЯ

Keywords: *SALIX ACUTIFOLIA*, BIOACTIVE  
SUBSTANCES, HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY, SELECTION CATEGORY

**Введение.** Ива остролистная (*Salix acutifolia*) является продуцентом биологически активных веществ. В коре ивы содержится целый комплекс БАВ: фенольные гликозиды, флавоноиды, дубильные вещества конденсированной природы, аскорбиновая кислота. Наибольший интерес представляют фенольные соединения ивы - салицилаты [1,2]. Экстракт коры ивы, содержащий производные салицилового спирта, обладает

противомикробным, противовоспалительными, обезболивающими, жаропонижающими и противоопухолевыми свойствами. Противовоспалительное действие салицилатов обусловлено их способностью ингибировать активность фермента циклооксигеназы. Именно с этим и связан противовоспалительный и анальгетический эффект коры ивы и множества других синтетических «аспиринов». Однако в отличие от своих искусственных аналогов, экстракт ивовой коры обладает меньшим числом побочных эффектов [2-11]. В связи с этим, производство фармакологической продукции из природного растительного сырья является весьма необходимым. Однако «природный аспирин» значительно дороже своего синтетического аналога. Для того чтобы изменить ситуацию, необходимо извлекать салицилаты из природного сырья с высоким содержанием биологически активных веществ. Современный тренд повышения эффективности производств по экстракции БАВ заключается в повышении качества исходного сырья, как по количеству, так и по качественному содержанию. На мировом рынке наиболее востребованным является сырье с заданными характеристиками, адаптированными под разработанные методики экстракции. Решением данной проблемы может стать плантационное выращивание деревьев – продуцентов биологически активных веществ с заранее известным содержанием активных составляющих. Для этого необходимо провести работы по выявлению наиболее продуктивных генотипов ивы остролистной.

В 2007 и 2008 годах было проведено исследование межпопуляционной изменчивости ивы остролистной по содержанию салицилатов [3,12]. Было выявлено, что средние значения концентрации салицилатов в коре молодых побегов ивы остролистной между популяциями отличаются незначительно. Однако было установлено, что значительная изменчивость среднего содержания салицилатов ивы

наблюдается внутри популяции. Что свидетельствует о возможности отбора наиболее «продуктивных» особей по изучаемому признаку внутри самих популяций [3].

Таким образом, селекцию ивы остролистной целесообразно осуществлять через индивидуальный отбор особей, так как проведенные исследования показали, что влияние межпопуляционной изменчивости незначительны по сравнению с индивидуальной изменчивостью генотипов ивы внутри географически разделенной популяции.

**Цель** работы – проведение селекционной оценки популяции Ивы остролистной с выявлением особей с высокой продуктивностью биологически активных веществ.

#### **Материалы, методы и объекты исследований.**

Для оценки продуктивности выбранной популяции ивы остролистной, с 24 растений 6-10 летнего возраста, с южной стороны, отобрали молодые побеги. Исходные растения не были повреждены грибковыми, бактериальными и вирусными болезнями и находились в состоянии интенсивного роста. Молодые побеги срезали секатором и укладывали в пакеты согласно нумерации. Деревья нумеровали металлическими этикетками, не повреждая кору дерева.

Лабораторные исследования проводили на базе Центра коллективного пользования «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ». Для каждого образца определяли процентное содержание общего салицина и оценивали долю коры.

#### *Хроматографический анализ.*

Процентное содержание общего салицина определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого кору с образцов ивы отделили от побега и высушили при комнатной температуре в течение 2 – 3 дней до воздушно-сухого состояния. Затем сырье измельчили до размера частиц не более 2 мм. Далее из измельченной коры

готовили экстракт. Для чего в коническую колбу Эрленмейера на 250 мл поместили 1 г измельченной сухой коры и 50 мл воды, очищенной с помощью системы очистки воды MilliporeSimplicity. Получившийся экстракт нагрели в автоклаве при температуре 120°C и давлении 0,7 атмосфер в течение 15 минут. Далее экстракты отфильтровали через бумажный фильтр и отобрали 1 мл фильтрата для хроматографического анализа. Затем к 1 мл экстракта добавили 0,5 мл 0,1 н NaOH и выдержали в течение 60 мин. при  $t = 60$  °C. После этого добавили 0,5 мл 1 н HCl (для остановки гидролиза). Для хроматографирования использовали образец смеси, предварительно очищенный с помощью мембранного фильтра PTFE-13-2 (Supelco) с диаметром пор 0,2 мкм.

Содержание общего салицина в коре ивы (P, %) вычисляли по формуле:

$$P = \frac{c \times D \times 100}{m},$$

где  $c$  - концентрация салицина в анализируемой пробе, мг/мл;  $D$  - фактор разбавления, мл;  $m$  - масса коры, используемой для анализа, мг.

$$c = a + S_1 \times b,$$

где  $S_1$  - площадь пика салицина на хроматограмме анализируемой пробы, мкВ $\times$ с;  $a$  и  $b$  коэффициенты, равные -6,03 и 63,74 соответственно.

#### *ЯМР-спектроскопия.*

Проведение селекционных исследований для отбора лучших особей требует сохранения исходного биологического материала. Методы, основанные на принципе ядерного магнитного резонанса, позволяют сохранить растения в жизнеспособном виде с целью дальнейшего размножения ценных особей в культуре *in vitro*.

Объектами исследования являлись 2-3-летние побеги ивы остролистной. Измерение доли коры производили у побегов диаметром от 3 до 12 мм. С помощью ЯМР томографа были получены изображения поперечного среза побега. Анализ изображений проводился в специально разработанной программе «Imagine». Кора побегов ивы содержит значительно большее количество воды, приходящееся на единицу объема, чем древесина. Среднее значение времени спин-спиновой релаксации T2 тканей коры оказывается больше 10 миллисекунд, в то время как T2 тканей древесины не превышает 300 - 400 микросекунд. Это дает возможность создания контраста в ЯМР томографическом изображении между различными тканями (ксилемой и флоэмой). При анализе ЯМР томографического среза нормального к направлению роста побега получается светлое кольцо, соответствующее коре (рисунок 1). Площадь этого светлого кольца оказывается пропорциональной доле коры в побеге.



Рисунок 1 - ЯМР томографическое изображение поперечного среза побега ивы остролистной.

**Результаты и обсуждение.** Для каждого из 24 растений ивы остролистной определяли процентное содержание общего салицинаи площадь коры (таблица 1).

Хроматографический анализ образцов коры ивы остролистной показал, что содержание салицилатов в них колеблется в пределах от 8,1%

до 14%. Наиболее продуктивным генотипом, по изучаемому признаку, является образец № 3, наименее продуктивным – образец № 1.

Принимая во внимание данные по процентному содержанию салицилатов и по площади коры, вычислили комплексную продуктивность изучаемых деревьев по формуле:

$$P = 0,1 \times A \times C,$$

где  $P$  - комплексную продуктивность, %;  $A$  - площадь коры, %;  $C$  - содержание салицилатов, %.

В данной работе под понятием комплексная продуктивность подразумевается параметр, который позволяет учитывать оба изучаемых вида продуктивности, а именно процентное содержание салицилатов и площадь коры.

Этот показатель помог выявить генотипы с наилучшими значениями по двум изучаемым признакам: содержанию салицилатов и доле коры (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение растений ивы остролистной в группы по продуктивности салицилатов.

Номер модельного дерева	Доля коры, %	Содержание салицилатов, %	Комплексная продуктивность салицилатов на 1 тонну сырья, кг	Селекционная категория	Селекционная категория
3	33,6	14	47,0	1	max
16	35,3	12,6	44,5	1	
5	39,4	10,6	41,8	1	
20	30,7	13,6	41,8	1	
14	35,9	11,3	40,6	1	
21	29,8	13,5	40,2	1	
11	34,7	11,5	39,9	2	med
19	29,9	13,3	39,8	2	
8	36,7	10,3	37,8	2	
7	34,2	10,7	36,6	2	
15	29,5	12	35,4	2	
9	29,9	11,7	35,0	2	
23	29,8	11,7	34,9	2	
22	36,9	9,3	34,3	2	
24	29,9	11	32,9	2	
17	26,4	12,4	32,7	2	
18	26,3	12,1	31,8	2	
2	35,7	8,7	31,1	2	
1	37,9	8,1	30,7	2	
10	31,8	9,3	29,6	3	min
13	32,0	8,8	28,2	3	
12	30,2	8,9	26,9	3	
4	22,9	11,7	26,8	3	
6	26,4	9,6	25,3	3	

Полученные данные позволили выделить наиболее и наименее продуктивные по изучаемым признакам модельные деревья ивы остролистной. Каждому модельному дереву была присвоена селекционная категория: 1(*max*) – модельные деревья с высоким показателем комплексной продуктивности, 2 (*med*) – генотипы со средним показателем, 3 (*min*) – модельные деревья с низкими значениями содержания салицилатов и доли коры (таблица 2).

Таблица 2 –Сравнение селекционных категорий по доле коры, содержанию салицилатов и комплексной продуктивности

Селекционная категория	Доля коры ± ошибка, %	Среднее квадратическое отклонение	Количество	Точность, %	Вариация, %
1	34,1 ± 1,4	12,6	6	4,2	10,4
2	32,1 ± 1,1	16,2	13	3,5	12,5
3	28,7 ± 1,8	15,4	5	6,1	13,7
	Содержание салицилатов ± ошибка, %				
1	12,6 ± 0,6	1,9	6	4,5	10,9
2	11,0 ± 0,4	2,3	13	3,8	13,9
3	9,7 ± 0,5	1,4	5	5,5	12,3
	Комплексная продуктивность салицилатов на 1 т. сырья, ± ошибка, кг				
1	42,6 ± 1,1	6,9	6	2,5	6,1
2	34,8 ± 0,8	9,4	13	2,4	8,8
3	27,3 ± 0,7	2,6	5	2,6	5,9

К первой селекционной категории были отнесены деревья с показателем комплексной продуктивности в пределах от 40 – до 49 кг/т сырья. Это означает, что при заготовлении 1 тонны прута с деревьев этих генотипов, после извлечения БАВ можно получить от 40 – до 49кг салицилатов. К этой селекционной категории были отнесены модельные деревья под номерами: 3, 16, 5, 20, 14 ,21.

Ко второй селекционной категории были отнесены модельные деревья со значением комплексной продуктивности от 30 – до 39кг/т сырья, это генотипы деревьев под номерами: 11, 19, 8, 7, 15, 9, 23, 22, 24, 17, 18, 2, 1.

К третьей селекционной категории были отнесены модельные деревья со значением комплексной продуктивности от 20 – до 29 кг/т сырья, под номерами: 10, 13, 12, 4, 6. Плантации, созданные потомством этих деревьев, принесут наименьший экономический эффект.



Таким образом, мы выявили целую группу особей ивы остролистной с высокой продуктивностью. Однако наилучшими характеристиками обладает образец №3.

**Выводы.** Процентное содержание салицилатов в коре деревьев исследуемой модельной популяции колеблется в пределах от 8,1 % до 14 %. Наиболее продуктивным растением, по изучаемому признаку, является генотип № 3, наименее продуктивным – генотип № 1. Соотношение доли коры и древесины у изучаемых деревьев *Salix acutifolia* находится в пределах 22,9 - 39,4 %. Наибольшая доля коры отмечена у модельного дерева № 5, а наименьшая у № 4. Критерием отбора деревьев предложено считать комплексную продуктивность, учитывающую значения содержания салицилатов и доли коры. Определены селекционные категории деревьев: 1 категория: деревья с высокой продуктивностью - (40– 49кг/т сырья); 2 категория: деревья со средней продуктивностью – (30 – 39 кг/т сырья); 3 категория: деревья с низкой продуктивностью – (20 – 29 кг/т сырья).

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7089 от 12 июля 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».*

### Литература

1. Julkunen-Tiitto, R. The effect of the sample preparation method on extractable phenolics of salica species / R. Julkunen-Tiitto, J. Tahavanainen // *Planta Med*, - 1989. - V. 55. - P. 55-58.

2. Определитель растений on-line [Электронный ресурс] // Ивы остролистной. - URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/32954.html> - 16.05.2013

3. Коптина А.В. Получение биопродуктов из коры ивы *Salix Acutifolia*: Дис. канд. техн. наук: 03.01.06 / Щелково, 2010. – 149с.

4. Marz, R.W. Willow bark extract-effects and effectiveness. Status of current knowledge regarding pharmacology, toxicology and clinical aspects / R.W. Marz, F. Kemper // *Wien Med Wochenschr*, - 2002. - V. 152. - P. 354-359.

5. Кортиков, В.Н. Справочник лекарственных растений / В.Н. Кортиков, А.В. Кортиков. - Ростов / нД: "Издательский Дом "Проф-Пресс", 2005. - 800 с.

6. Юрьев, К.Л. Новый противовоспалительный фитопрепарат Ассаликс: «назад в будущее» / К.Л. Юрьев // *Український медичний часопис*, - 2005. - №. 4(48). - С. 113-131.

7. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain / S. Chrubasik, O. Kunzel et al. // *Rheumatology (Oxford)*, - 2001. - V. 40. - P. 1388-1393.

8. Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study / S. Chrubasik, O. Kunzel et al. // *Phytomedicine*, - 2001. - V. 8. - P. 241-251.

9. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study / S. Chrubasik, E. Eisenberg et al. // *Am J Med*, - 2000. - V. 109. - P. 9-14.

10. Inhibition activities of natural products on serine proteases / A. Jedinak, T. Maliar et al. // *Phytother Res*, - 2006. - V. 20. - P. 214-217.

11. The effect of willow leaf extracts on human leukemic cells in vitro / H.A. El-Shemy, A.M. Aboul-Enein et al. // *J Biochem Mol Biol*, - 2003. - V. 36. - P. 387-389.

12. Сергеев П.В. Селекция и технология микрклонального размножения ивы остролистной (*Salix Acutifolia Willd.*): Дис. канд.с.-х. наук: 06.03.01 / Йошкар–Ола, 2011. – 105 с.

### References

1. Julkunen-Tiitto, R. The effect of the sample preparation method of extractable phenolics of salicaceae species / R. Julkunen-Tiitto, J. Tahavanainen // *Planta Med*, - 1989. - V. 55. - P. 55-58.

2. Oprelitel' rastenij on-line [Elektronnyj resurs] // Ivy ostrolistnoj. - URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/32954.html> - 16.05.2013

3. Коптина А.В. Получение биопродуктов из коры ивы *Salix Acutifolia*: Дис. канд. техн. наук: 03.01.06 / Shhelkovo, 2010. – 149s.

4. Marz, R.W. Willow bark extract-effects and effectiveness. Status of current knowledge regarding pharmacology, toxicology and clinical aspects / R.W. Marz, F. Kemper // *Wien Med Wochenschr*, - 2002. - V. 152. - P. 354-359.

5. Kortikov, V.N. Spravochnik lekarstvennyh rastenij / V.N. Kortikov, A.V. Kortikov. - Rostov /nD: "Izdatel'skij Dom "Prof-Press", 2005. - 800 с.

6. Jur'ev, K.L. Novyj protivovospalitel'nyj fitopreparat Assaliks: «nazad v budushhee» / K.L. Jur'ev // *Ukraïns'kijmedichnijchasopis*, - 2005. - №. 4(48). - С. 113-131.

7. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain / S. Chrubasik, O. Kunzel et al. // *Rheumatology (Oxford)*, - 2001. - V. 40. - P. 1388-1393.

8. Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study / S. Chrubasik, O. Kunzel et al. // *Phytomedicine*, - 2001. - V. 8. - P. 241-251.

9. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study / S. Chrubasik, E. Eisenberg et al. // *Am J Med*, - 2000. - V. 109. - P. 9-14.

10. Inhibition activities of natural products on serine proteases / A. Jedinak, T. Maliar et al. // *Phytother Res*, - 2006. - V. 20. - P. 214-217.

11. The effect of willow leaf extracts on human leukemic cells in vitro / H.A. El-Shemy, A.M. Aboul-Enein et al. // *J BiochemMolBiol*, - 2003. - V. 36. - P. 387-389.

12. Sergeev R.V. Selekcija I tehnologija mikroklonal'nogo razmnozhenija ivy ostrolistnoj (*Salix AcutifoliaWilld.*): Dis. kand.s.-h. nauk: 06.03.01 / Joshkar–Ola, 2011. – 105 s.