

**ЧМЕЛЕВА С.И., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ЮРКОВА И.Н., ПАНОВ Д.А.,  
БУГАРА И.А., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ТАЙКОВА В.П.**

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,  
Украина, 95007, Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4,  
e-mail: nanosilver@rambler.ru*

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Высшие растения синтезируют широкий спектр биологически активных вторичных метаболитов. Значительную часть продуктов вторичного метаболизма, имеющих фармакологическую ценность, получают из дикорастущего лекарственного сырья или интродуцированных растений [1, 2]. Традиционный подход требует значительных земельных ресурсов и затрат на выращивание, переработку сырья, является недостаточно эффективным. Одним из приоритетных направлений в настоящее время является разработка биотехнологических основ получения клеточных культур лекарственных растений, которые могут служить в качестве сырья, содержащего фармакологически ценные вторичные метаболиты (гликозиды, фенольные соединения, алкалоиды, сантонины). Исследования по получению клеточных культур — продуцентов вторичных метаболитов проводятся во многих странах мира. В Украине такие технологии разрабатываются на уровне лабораторных и, частично, промышленных регламентов.

Целью исследований является: оптимизация условий получения клеточных культур лекарственных растений и выявление закономерностей накопления в них ценных продуктов фармакологического назначения.

### **Материал и методы**

Материалом исследования были ткани и органы следующих видов: Гинкго двулопастный — *Ginkgo biloba* L., Тисс ягодный — *Taxus baccata* L., Олеандр обыкновенный — *Nerium oleander* L.

В качестве эксплантов были взяты сегменты вегетативных органов (листовой пластинки, черешки, побеги в зоне прикрепления листьев, изолированные семязпочки).

При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [3, 4].

Для культивирования эксплантов применялись модифицированные по содержанию фитогормонов (2,4-Д, ИУК, НУК, БАП) питательные среды Мурасиге и Скуга, Гамборга. Экспланты культивировали при освещенности 4–5 тыс. люкс, температуре 20–24 °С и относительной влажности воздуха 60–70%. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Полученный каллус субкультивировали на модифицированные питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) и Гамборга, дополненные 2,4-Д — 2,0 и 2,5 мг/л, БАП — 0,3 и 0,4 мг/л.

Для химического анализа на содержание тритерпеновых гликозидов каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, извлекали из культуральных пробирок и высушивали при комнатной температуре. Воздушно-сухую массу тщательно измельчали и экстрагировали 80% изопропиловым спиртом. Для определения тритерпеновых гликозидов использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках “Silufol” [5], в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (100:40:7). Детектирование фракций тритерпеновых гликозидов на хроматограммах осуществляли 10% спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с добавлением 2% *para*-оксibenзальдегида с последующим нагреванием хроматограмм при 100–120 °С. В качестве контроля использовали водно-спиртовые экстракты из органов интактных растений.

### Результаты и обсуждение

Вторичные метаболиты *G. biloba* являются очень мощными и действенными лекарственными средствами, занимающими в современной медицине одно из самых ведущих мест.

Из литературы известно, что листья, семена и древесина гинкго выделяют вещества разных химических групп с различной фармакологической и терапевтической активностью [6]. Листья гинкго содержат флавоноловые гликозиды — производные кемпферола и кверцетина, мирицетин, бифлавоноиды и их гликозиды (бисмозиды): сиядопитизин (5%), билобетин (5%), гинкгетин (20%), изогинкгетин (18%), аментофлаван (1%), а также антоцианидин.

В результате проведенных исследований по введению тканей *G. biloba* в культуру *in vitro* было показано, что направленность процессов развития тканей зависит от типа экспланта, его физиологических особенностей, морфогенетических потенций и условий культивирования. При введении в культуру различных типов эксплантов (сегменты молодой листовой пластинки, черешки листьев, семяпочки) у *G. biloba* образование каллуса происходило у всех типов эксплантов. Максимальная частота каллусообразования наблюдалась на сегментах молодых листовых пластинок до 98,6%. Показатель частоты каллусообразования при использовании в качестве эксплантов фрагментов черешков листа был несколько ниже (от 9,1% до 85,4%). И довольно низкая частота каллусообразования наблюдалась у эксплантов — изолированных семяпочек (16,6–46,6%).

Решающее значение для индукции каллусогенеза в культуре тканей *G. biloba* играет наличие в культуральной среде веществ как с цитокининовой активностью, так и ауксиновых ростовых факторов. Образование каллуса происходило только на средах, дополненных экзогенными стимуляторами роста, обычно на 15–25 день культивирования. Максимальное образование каллуса наблюдалось на питательной среде МС, дополненной 1,0 мг/л ИУК, 2,5 мг/л 2,4-Д, 0,4 мг/л 6-БАП у всех типов эксплантов. Максимальная частота каллусообразования у сегментов молодой листовой пластинки составила 98,6%, черешков листьев 86,4%, у семяпочек 46,6%. При увеличении концентрации 6-БАП до 0,5–0,6 мг/л, а также увеличении кон-

центраций ИУК (1,5 мг/л) и 2,4-Д (3,0 мг/л) показатель частоты каллусообразования снижался у всех эксплантов.

Химический анализ каллусных культур, полученных из сегментов молодой пластинки *G. biloba* показал, что каллус содержит фенольные соединения, характерные для интактного растения [7]. Были выявлены десять фракций фенольных соединений, из которых шесть фракций анакардовой кислоты и четыре фракции билобола.

Поскольку исследований по химическому анализу каллусных культур гинкго двулопастного на содержание фенольных соединений ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих фенольные соединения, что открывает возможности для дальнейших исследований, направленных на селективный отбор и получение каллусных и суспензионных культур, обладающих повышенной продуктивностью отдельных фракций фенольных соединений и биологической активностью, а каллусная культура может быть использована как источник их получения.

Все органы *T. baccata* содержат дитерпеноиды, главными среди них являются таксол, лигнаны, таксирезинол и его производные, стероиды, цианогенные соединения; в хвое, кроме того, содержатся сесквитерпеноиды, алкалоиды, главным среди них является эфедрин, флавоноиды, гинкгетин, секвойяфлавоны, антоцианы [8, 9]. Из биомассы игл *T. baccata* был получен алкалоид баккатин, который послужил основой для химического синтеза второго таксанового производного — доцетаксела. В настоящее время паклитаксел и его полусинтетический аналог доцетаксел назначаются для лечения рака различных органов.

Исходя из этого, возникает необходимость поиска альтернативного способа получения таксола. Таким способом может оказаться создание технологий получения культуры клеток тиса, синтезирующих таксол в достаточном количестве, что в перспективе открывает возможность селекции наиболее продуктивных клеточных линий.

Максимальная частота каллусообразования у *T. baccata* наблюдалась на сегментах летних побегов на питательной среде Гамборга В<sub>5</sub> (85,0%). Показатель частоты каллусообразования при использовании в качестве эксплантов сегментов зимних побегов был несколько ниже как на среде В<sub>5</sub> (75,3%), так и на питательной среде МС (60,5%). Несколько ниже была частота каллусогенеза у эксплантов молодых верхушечных листьев: 56,3% (В<sub>5</sub>) и 51,3% (МС).

Образование каллуса наблюдали у зимних побегов на 20–25 день, а у летних — на 10–15 день. Максимальное образование каллуса наблюдалось на средах МС и Гамборга, содержащих 2,0 мг/л 2,4-Д, 4,0 мг/л НУК, 1,0 мг/л 6-БАП. При уменьшении концентрации НУК до 1,0–2,0 мг/л показатель на среде Гамборга частоты каллусообразования у всех изученных эксплантов снижался.

Более высокие показатели частоты каллусогенеза у всех эксплантов наблюдались на всех вариантах питательной среды Гамборга. Поэтому

оптимальной питательной средой для получения первичных каллусных культур *T. baccata* нами была определена питательная среда Гамборга В<sub>5</sub>, дополненная 4,0 мг/л НУК, 2,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л 6-БАП и активированным углем (1 г/л).

Исследование влияния фитогормонов в питательных средах для пассирования каллусной культуры *T. baccata*, полученной из разных типов эксплантов, показало, что уменьшение концентрации НУК и добавление в среду кинетина (0,5 мг/л) повышает интенсивность прироста биомассы до 50–80%. При этом каллусная культура, полученная из фрагментов летних побегов, отличается активным ростом в сравнении с каллусной культурой из зимних побегов и сегментов молодых листьев.

В качестве инициальных эксплантов для получения каллусных тканей олеандра обыкновенного *N. oleander*, использовали сегменты зрелых листьев и стебля в зоне прикрепления листьев. Проведенные исследования показали, что состав питательной среды оказывал значительное влияние на индукцию каллусообразования в культуре тканей *N. oleander in vitro*.

Максимальная частота каллусообразования (94,0–95,0%) наблюдалась на модифицированной питательной среде МС, дополненной 0,5 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. При культивировании эксплантов на питательной среде МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 6-БАП частота индукции каллусообразования составила 81,0–86,0%. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования была достоверно ниже и не превышала 61%.

При введении эксплантов в условиях *in vitro* первые признаки каллусогенеза визуально обнаруживались на 10–14 сутки культивирования, независимо от состава питательной среды и типа экспланта.

Исследование состава и содержания гликозидов в интактных растениях олеандра обыкновенного, выявило 9 основных фракций сердечных гликозидов, из которых — пять фракций гитоксигенина, две фракции дигитоксигенина и две фракции дигоксигенина. При этом в стеблях обнаружено четыре фракции, из них три гитоксигенина (А) и одна дигитоксигенина (В), а в листьях три фракции дигоксигенина (С).

Химический анализ каллусных культур индуцированных из эксплантов листовых сегментов и стеблей показал, что количество выявленных фракций сердечных гликозидов зависело от питательной среды и не зависело от типа экспланта. Максимальное количество фракций сердечных гликозидов было обнаружено в каллусных культурах, пассируемых на среде МС, содержащей 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л ИУК, 0,5 мг/л кинетин, 0,5 мг/л 6-БАП.

### **Выводы**

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать условия получения первичных каллусных культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* и их субкультивирования. Исследованы ростовые параметры каллусных культур и выделены штаммы с повышенным ростовым индексом, содержащие биологически активные вещества.

## Литература

1. Кунах В.Р. Биотехнологія лікарські рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 730 с.
2. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений.— М.: Наука, 1991.— С. 5–20.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— К.: Наукова думка, 1980.— 488 с.
4. Культура клеток растений: [Сб. ст.] / АН СССР, Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева / Отв. ред. Р.Г. Бутенко.— М.: Наука, 1981.— 168 с.
5. Шаришнова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии.— М.: Мир, 1980.— 621 с.
6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции.— М.: Наука, 1989.— 254 с.
7. Скиба А.А., Чмелева С.И. Каллусные культуры гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) — продуценты важных биологически активных веществ // Биология від молекули до ноосфери: матеріали II Міжнар. конф. (Харків, 19–21 лист. 2007 р.).— Х.: Планета-Принт, 2007.— С. 416.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства.— М.: Новая волна, 2008.— Т.2.— 1206 с.
9. Пасишниченко В.А. Новый альтернативный путь биосинтеза изопреноидов у бактерий и растений // Биохимия.— 1998.— Т.63, №2.— С. 171–182.

## Резюме

Проведенные исследования позволили оптимизировать условия получения первичных каллусных культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* и их субкультивирования. Исследованы ростовые параметры каллусных культур и выделены штаммы с повышенным ростовым индексом, содержащие биологически активные вещества.

Проведені дослідження дозволили оптимізувати умови отримання первинних калюсних культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* та їх субкультивування. Досліджено ростові параметри калюсних культур і виділено штами з підвищеним ростовим індексом, які містять біологічно активні речовини.

Our studies have allowed to optimize the conditions for receiving primary callus cultures of *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* and subculturing. The growth parameters of callus cultures were investigated and isolated strains with increased index containing biologically active substances.

## ЧУРИКОВА О.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы,  
e-mail: ochurikova@yandex.ru, vvmur@hotmail.ru

## ПОДДЕРЖАНИЕ И ВОЗОБНОВЛЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВОЙ СИРЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ

Сокращение биологического разнообразия — одна из основных глобальных экологических проблем, стоящих перед человечеством на современном этапе. Постоянно существующая в мире угроза генетическим ресур-