

13. Сиволапов В.А. Получение регенерантов *in vitro* березы для создания лесных культур / В.А. Сиволапов, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов, А.И. Чернодубов // Восстановление эколого-ресурсного потенциала агролесобиоценозов, лесоразведение и рациональное природопользование в Центральной лесостепи и юге России: сб. науч.-исслед. работ / под ред. авторов; ГОУ ВПО «ВГЛТА», 2007. – С. 157-160.

#### **Резюме**

Показаны результаты использования биотехнологии *in vitro* для размножения ценных форм ольхи черной и серой, березы повислой и карельской, тополя сереющего. Получены регенеранты, проведена адаптация в открытом грунте, созданы культуры тополя, ольхи и березы в лесхозах Воронежской области

There were shown the results of the use of *in vitro* biotechnology for the propagation of valuable forms of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*, *Betula verrucosa* and *Betula verrucosa f. carelica*, *Populus canescens*. There were received regenerates, carried out adaptation in field conditions, established same cultures of alna, betula and poplar in the forest rangers of Voronech region.

**БУГАРА А.М., ЮРКОВА И.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., БУГАРА И.А., ПАНОВ Д.А.**  
Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Украина АР Крым,  
95007, г. Симферополь, просп. Вернадского 4  
e-mail: nanasilver@rambler.ru

### **ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСИИ ЯПОНСКОЙ (*FATSIA JAPONICA* DECHE. ET PLANCH) И АНАЛИЗ В НИХ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ**

Растения способны синтезировать и накапливать различные вещества вторичного метаболизма, многие из которых представляют интерес для фармакологии. В качестве источников лекарственного сырья используются, как правило, дикорастущие виды. Плантационное выращивание лекарственных растений, содержащих вторичные метаболиты, далеко не всегда дает положительные результаты. При плантационном выращивании может значительно снижаться содержание вторичных метаболитов, а многие растения тропической и субтропической флоры практически не возможно выращивать вне этих климатических зон [1].

Фармацевтическая промышленность может рентабельно использовать вторичные метаболиты, которые синтезируются и накапливаются в клетках культивируемых *in vitro*. Использование клеточных культур для получения вторичных метаболитов имеет ряд преимуществ. Они базируются на возможности получения и использования экологически чистого сырья, управления процессом биосинтеза, создания клеточных культур сверхпродуцентов, накапливающих вторичные метаболиты в значительно больших количествах, чем интактные растения [1,2].

Фатсия японская (*Fatsia japonica* Deche. et Planch) – ценное лекарственное растение, которое содержит целый ряд биологически активных веществ: тритерпеновые гликозиды, протокатехиновую кислоту, холин, танины, эфирное масло и др. Это растение издавна используется в народной медицине как тонизирующее средство и анальгетик при болях в суставах, ревматизме и гастрите. На основе растительной массы фатсии выпускается лекарственный препарат "Фатцифлогин", обладающий противовоспалительным действием. Фатсия японская не выращивается как плантационное растение. В этой связи представляет интерес получение клеточных культур данного вида, как потенциального источника сырья для получения биологически активных веществ.

Целью настоящей работы заключалась в подборе условий получения каллусных культур фатсии японской и анализе в них тритерпеновых гликозидов.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили растения фатсии японской, выращиваемые в условиях закрытого грунта. В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты молодых листьев и черешков листа. Растительный материал поверхностно стерилизовали 50%-ным раствором препарата брадофен в течение 10 минут, а затем трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. В стерильных условиях ламинарного бокса экспланты помещали на поверхность различных модификаций агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга [3], дополненной 2,4-дифенилуксусной кислотой (2,4-Д) и 6-бензиламинопурином (БАП). Экспланты культивировали в темноте и при освещенности 4-5 тыс. люкс (фотопериод 16 часов), температуре 22-24° С и относительной влажности воздуха 60-70 %.

В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2x20 см, содержащие 10 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов определенного типа в трёхкратной повторности. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Субкультивирование проводили через 21 день, при этом масса транспланта составляла около 100 мг. Для субкультивирования использовали восемь модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга: оптимальную для индукции каллусообразования, безгормональную и среды, дополненные 2,4-Д, БАП и гибберелловой кислотой в различных концентрациях. Прирост сырой биомассы определяли в процентах от исходной в конце цикла выращивания культуры.

Для определения тритерпеновых гликозидов использовали метод тонкослойной хроматографии [4]. Каллусные культуры второго пассажа, индуцированные из листовых сегментов, находящиеся в стационарной фазе роста, высушивали при комнатной температуре и измельчали в ступке. Сумму тритерпеновых гликозидов экстрагировали изопропанолом. Смесь нагревали на водяной бане до температуры кипения изопропанола. На хроматографические пластины "Sorbfil" наносили по 0,2 мл смеси в потоке теплого воздуха. Разделение гликозидов на фракции проводили в системе растворителей хлороформ : метанол : вода = 100 : 30 : 5. Пластины высушивали и обрабатывали 20% раствором фосфорновольфрамной кислоты, а затем проявляли при температуре 100 – 120°С в течение нескольких минут. В качестве контроля использовали водно-спиртовой экстракт из листьев фатсии японской.

### Результаты и обсуждение

При введении в изолированную культуру сегментов листьев и черешков листа фатсии японской индукция каллусогенеза наблюдалась на 12-14 сутки культивирования. Каллус имел светло-зеленую окраску и плотную консистенцию, при этом частота каллусообразования в значительной степени зависела от состава питательной среды и типа экспланта (табл.). Максимальная частота каллусообразования обнаруживалась на питательной среде, дополненной 1 мг/л 2,4-Д и составляла для эксплантов листовых сегментов 50, а для сегментов листовых черешков 70%. На питательных средах, дополненных БАП, наблюдалась тенденция к снижению частоты каллусообразования и она не превышала 40%.

*Таблица*

**Частота каллусообразования в изолированной культуре фатсии японской в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды**

Типы и концентрации гормональных добавок в питательной среде, мг/л		Тип экспланта	Частота каллусообразования, %
2,4 -Д	БАП		

-	-	Сегменты листа	0
		Сегменты листового черешка	0
0,2	-	Сегменты листа	10,1±0,3
		Сегменты листового черешка	20,4±0,6
1	-	Сегменты листа	50,4±1,3
		Сегменты листового черешка	70,3±1,6
4	-	Сегменты листа	40,4±1,2
		Сегменты листового черешка	60,1±1,6
1	0,5	Сегменты листа	10±0,24
		Сегменты листового черешка	20±0,33
2	0,5	Сегменты листа	20,1±0,3
		Сегменты листового черешка	40,3±0,4
1	2	Сегменты листа	5,1±0,1
		Сегменты листового черешка	7,2±0,1

При субкультивировании была выявлена зависимость прироста биомассы каллусной культуры от состава питательной среды. Максимальный прирост биомассы наблюдался на питательной среде оптимальной для индукции каллусогенеза, содержащей 2,4-Д в концентрации 1 мг/л.

Использование метода тонкослойной хроматографии позволило выявить в интактных листьях фатсии 6 различных фракций монотерпеноидных тритерпеновых гликозидов, из которых – две фракции хедерагенина (синие-фиолетовые хроматографические зоны **C**, **F**), три фракции олеаноловой кислоты (хроматографические зоны розового цвета **A**, **D**, **E**) и одна фракция эхиноцистовой кислоты (хроматографические зоны розового цвета **B**). Установлено, что фракция **A** представляет собой 3-О- $\alpha$ -L- арабинопиранозид олеаноловой кислоты, фракция **B** – 3-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид эхиноцистовой кислоты, фракция **C** – 3-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид хедерагенина, фракция **D** – 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1→2)-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты, фракция **E** – 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты и фракция **F** – 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид хедерагенина (рис).

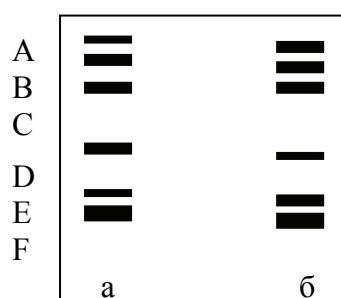


Рис. Хроматограммы фракций тритерпеновых гликозидов, содержащихся в интактных листьях (а) и каллусных культурах (б) фатсии японской

В каллусных культурах, индуцированных из листьев фатсии японской, были выявлены фракции гликозидов, характерные для интактных листьев. Причем концентрации 3-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты в каллусе превышали таковую в листьях.

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред и оптимальные типы эксплантов для получения каллусных культур

фатсии японской. Методом тонкослойной хроматографии показано присутствие в каллусных культурах, индуцированных из листьев, фракций тритерпеновых гликозидов, характерных для интактных органов. Изложенные результаты подтверждают уже известные факты о возможности получения клеточных культур растений, содержащих тритерпеновые гликозиды [2]. В последние годы аналогичные данные удалось получить для каллусных культур *Hedera helix* L., *Clematis vitalba* L., *Cyclamen persicum* Mill. [5-7]. При этом также удалось показать, что в каллусных культурах отдельные фракции тритерпеновых гликозидов могут обнаруживаться в более высоких концентрациях, чем в интактных органах.

#### **Выводы**

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза в культуре листовых сегментов и черешков фатсии японской. Установлено, что максимальная частота каллусообразования наблюдалась на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 1,0 мг/л 2,4-Д.

2. Методом тонкослойной хроматографии показано, что пассируемые каллусные культуры фатсии японской содержали фракции тритерпеновых гликозидов аналогичные таковым интактных листьев.

#### **Литература**

1. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Кидкин А.Ф. и др. Биотехнология. Клеточная инженерия.- М.: Высшая Школа, 1987. – 127 с.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005.- 730 с.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473-497.
4. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. – М.: Мир, 1980. – 621 с.
5. Фазылов А.Р., Бугара А.М., Юркова И.Н. Горденко С.Л. Каллусные культуры плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.) как источник тритерпеновых гликозидов // Ученые записки ТНУ. – 2006. – 19, №1. – С. 101-104.
6. Бугара А.М., Чмелева С.И., Сидякин А.И., Панов Д.А. Введение в культуру *in vitro* вегетативных органов ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) и анализ тритерпеновых гликозидов в каллусных культурах / Збірник наук. праць "Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології". – 2007. – Т.2– С. 457-462.
7. Юркова И.Н., Бугара А.М. Культивирование в условиях *in vitro* каллусной ткани цикламена – источника биологически активных веществ // Ученые записки ТНУ. – 2006. – 19, №1. – С. 113-117.

#### **Резюме**

Подобраны условия для получения каллусных культур фатсии японской. Химический анализ показал присутствие в каллусных культурах основных фракций тритерпеновых гликозидов характерных для интактных органов.

Подобранно умови отримання калусних культур фатсії японської. Хімічний аналіз показав присутність в калусних культурах основних фракцій тритерпенових глікозидів, які характерні для інтактних органів.

Conditions for inductions of *Fatsia japonica* callus cultures were obtained. The chemical analysis showed the presence in callus culture the main fractions of glycosides which are characteristic for intact organs.