

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

**АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
В ДЛИТЕЛЬНОПАССИРУЕМЫХ КАЛЛУСАХ
ОТ ЭКСПЛАНТОВ ИСХОДНОЙ ФОРМЫ И СОМАКЛОНОВ
AGASTACHE RUGOSA (FISCH. & C.A.MEY.) KUNTZE (ЧАСТЬ 2)**

А.А. Кузовкова, Т.В. Мазур, В.Н. Решетников, Т.И. Новикова*, Е.В. Банаев*
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, ул. Сурганова,
2В, 220012, Беларусь, floraia@nm.ru

*ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101, Россия, alnus2005@mail.ru

Ключевые слова: Agastache rugosa (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, соматклоны, каллус, биологически активные вещества

Введение. В настоящее время все шире используют культивируемые органы, ткани и клетки растений для получения биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения: 1) традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение); 2) новосинтезируемых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу [1].

Основным типом культивируемой растительной клетки является каллус. Каллусная ткань возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток органов растения. Процессу образования каллуса предшествует дедифференцировка тканей экспланта. При дедифференцировке ткани теряют структуру, характерную для их специфических функций в растении, и возвращаются к состоянию делящихся клеток. При этом некоторые функциональные особенности

исходных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие модификации, что является одной из причин гетерогенности каллусной ткани. Помещая каллусную ткань в жидкую питательную среду, получают клеточную суспензию. Суспензионные культуры представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которая легко подвергается воздействию химических веществ. Их можно использовать как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксילирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации), что позволяет получить уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или вещества промежуточного обмена растений других видов. Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др. Также суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов, которые находят широкое применение в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и др. В настоящее время в разных странах около ста видов растений используется в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ (алкалоидов, терпеноидов, гликозидов, полифенолов, полисахаридов, эфирных масел, пигментов и др.) [1].

Цель нашего исследования — изучить, как различное тканевое происхождение клеток влияет на накопление БАВ в каллусах от корневых, стеблевых и листовых эксплантов соматоклонов и исходной формы многоколосника морщинистого, и отобрать наиболее перспективные каллусы для получения суспензионной культуры *A. rugosa*.

Материалы и методы. Растения *A. rugosa* культивировали асептически на среде Мурасиге-Скууга (МС) без добавления гормонов при фотопериоде — 16/8 часов свет/темнота, освещенности — 2–3 клк, температуре — $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Каллусы инициировали в темноте из листьев, стеблей и корней асептических растений *A. rugosa* на твердой $\frac{1}{2}$ среде МС с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Каждые 15–16 дней каллусы пассировали на новую среду. У каллусов 15-го пассажа анализировали суммарное содержание фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот.

Приготовление экстрактов всех исследуемых образцов проведено согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь [2] с нашими модификациями (проводили двукратную экстракцию веществ 70%-ным (о/о) этиловым спиртом). Суммарное содержание фенолов определяли методом Фолина-Чокальтеу, используя галловую кислоту в качестве стандарта (измерения при длине волны 765 нм), флавоноидов — в пересчете на лютеолин согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь [2] с нашими модификациями (измерения при длине волны 330 нм), оксикоричных кислот — согласно [3] (измерения при длине волны 330 нм). Испытуемый раствор — полученный спиртовой экстракт фенольных веществ без дополнительного разведения. Компенсационный раствор — 70 % (о/о) раствор этилового спирта. Оптическую плотность растворов измеряли в кварцевых кюветах толщиной 1 см.

Результаты и их обсуждение. В длительнопассируемых каллусах (15-ый пассаж), инициированных из листа, стебля и корня соматоклонов и исходной формы многоколосника морщинистого, оценено суммарное содержание фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот (таблицы 1 и 2). В каллусах любого происхождения (из листа, стебля, корня) всех соматоклонов по сравнению с каллусами исходной формы показано существенное увеличение суммарного содержания фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот. Так, в корневых каллусах соматоклонов суммарное содержание фенольных веществ составляет 128–244% от контроля, в стеблевых — 171–358 %, в листовых — 213–389 %. Содержание флавоноидов оказалось в корневых каллусах соматоклонов на 32–151 %, в стеблевых —

на 100–271%, в листовых — на 102–319% больше, чем в контроле. В корневых каллусах соматклонов содержание оксикоричных кислот составляет 133–254%, в стеблевых — 203–374 %, в листовых — 200–411 % от контроля.

Ранее нами в растениях-соматклонах в фазе цветения было показано увеличение суммарного содержания фенольных веществ (в соматклонах *Aga11* и *Aga20*, соответственно, на 66,66 и 42,83 %, а в *Aga34* и *Aga36*, соответственно, — лишь на 26,33 и 12,5%) и флавоноидов (в соматклонах *Aga11*, *Aga20*, *Aga34* и *Aga36*, соответственно, на 603,42; 273,29; 356,16 и 192,46%) [4] по сравнению с исходной формой. Таким образом, длительнопассируемый каллус, полученный из различных органов соматклонов, сохраняет характерные черты растений-соматклонов, касающиеся повышенного содержания фенольных веществ в целом, а также отдельных классов этих соединений (флавоноидов и оксикоричных кислот).

Исходя из вышеописанных результатов анализа содержания фенольных веществ в длительнопассируемых каллусах, инициированных из листа, стебля и корня соматклонов и исходной формы многоколосника морщинистого, нами в качестве наиболее перспективного материала для получения суспензионной культуры были выбраны следующие каллусы: корневого происхождения — от соматклона *Aga11*; стеблевого происхождения — от соматклона *Aga34*; листового происхождения — от соматклона *Aga20*.

Заключение. В длительнопассируемых каллусах (15-ый пассаж), инициированных из листа, стебля и корня соматклонов и исходной формы многоколосника морщинистого, оценено суммарное содержание фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот. В каллусах любого происхождения (из листа, стебля, корня) всех соматклонов по сравнению с каллусами исходной формы показано существенное увеличение суммарного содержания фенольных веществ, флавоноидов и оксикоричных кислот. В качестве наиболее перспективного материала для получения суспензионной культуры многоколосника морщинистого были выбраны каллус корневого происхождения от соматклона *Aga11*, стеблевого — от соматклона *Aga34*, листового — от соматклона *Aga20*.

Таблица 1 — Суммарное содержание фенольных соединений в каллусах 15-пассажа, инициированных из корневых, листовых и стеблевых эксплантов от исходной формы и соматклонов *Agastache rugosa*

Образец	Суммарное содержание ФС в пересчете на галловую кислоту в мг на грамм сырого веса	По отношению к контролю в %
Контроль	Корневой каллус	1,173±0,190
	Листовой каллус	0,783±0,272
	Стеблевой каллус	0,715±0,0257
Соматклон №11	Корневой каллус	2,356±0,177
	Листовой каллус	2,240±0,520
	Стеблевой каллус	1,899±0,327
Соматклон №20	Корневой каллус	2,863±1,107
	Листовой каллус	3,045±0,466
	Стеблевой каллус	1,226±0,294
Соматклон №31	Корневой каллус	2,237±0,494
	Листовой каллус	2,332±0,356
	Стеблевой каллус	1,930±0,178

Сомаклон №34	Корневой каллус	1,510±0,164	128,73
	Листовой каллус	2,260±0,228	288,63
	Стеблевой каллус	2,560±0,375	358,04
Сомаклон №36	Корневой каллус	1,609±0,328	137,17
	Листовой каллус	1,670±0,300	213,28
	Стеблевой каллус	2,152±0,304	300,98

Таблица 2 — Содержание суммы флавоноидов и оксикоричных кислот в каллусах 15-пассажа, инициированных из корневых, листовых и стеблевых эксплантов от исходной формы и соматклонов *Agastache rugosa*

Образец	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в % на грамм сырого веса	По отношению к контролю в %	Содержание оксикоричных кислот в ммоль/л на грамм сырого веса	По отношению к контролю в %	
Контроль	Корневой каллус	0.068±0.010	100	1.900±0.265	100
	Листовой каллус	0.054±0.011	100	1.533±0.289	100
	Стеблевой каллус	0.042±0.002	100	1.167±0.058	100
Сомаклон №11	Корневой каллус	0.171±0.033	251.47	4.833±0.929	254.37
	Листовой каллус	0.123±0.003	227.78	3.533±0.058	230.46
	Стеблевой каллус	0.133±0.009	316.67	3.700±0.265	317.05
Сомаклон №20	Корневой каллус	0.159±0.023	233.82	4.467±0.681	235.11
	Листовой каллус	0.226±0.045	418.52	6.300±1.249	410.96
	Стеблевой каллус	0.084±0.012	200	2.367±0.321	202.83
Сомаклон №31	Корневой каллус	0.159±0.033	233.82	4.467±0.907	235.11
	Листовой каллус	0.139±0.023	257.41	3.867±0.635	252.25
	Стеблевой каллус	0.121±0.006	288.10	3.400±0.173	291.35
Сомаклон №34	Корневой каллус	0.094±0.013	138.24	2.667±0.379	140.37
	Листовой каллус	0.138±0.013	255.56	3.867±0.404	252.25
	Стеблевой каллус	0.156±0.025	371.43	4.367±0.723	374.21
Сомаклон №36	Корневой каллус	0.090±0.012	132.35	2.533±0.351	133.32
	Листовой каллус	0.109±0.007	201.85	3.067±0.208	200.07
	Стеблевой каллус	0.113±0.007	269.05	3.200±0.300	274.21

Литература

6. Биотехнология. Культуры растительных клеток [Электронный ресурс].– 2011.– Режим доступа : <http://www.biotechnolog.ru>.– Дата доступа: 02.12.2011.
7. Государственная фармакопея Республики Беларусь, в 3-х т.– том 2.– 2008.– с.381.
8. Bauer N., Leljак-Levanic D., Jelaska S. Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth. // Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung.— 2004.— Vol.59c.— p.554–560.
9. Мазур Т.В., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В. Биотехнологический подход повышения содержания ценных метаболитов в растениях *Agastache rugosa* (Fisch. & S.A.Mey.) Kuntze // Биологически активные вещества растений — изучение и использование : Материалы Международной научной конференции, приуроченной к

55-летию Отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси и 75-летию академика НАН Беларуси В.Н. Решетникова, Минск, 29–31 мая 2013 г. — Минск: ЗАО «Конфидо». — стр. 336–337.

Исследование поддержано грантом НАНБ (БРФФИ) – СО РАН Б12СО-017.