

Коллекции каллусных культур лекарственных растений

**Юрин В. М.¹, Дитченко Т. И.¹, Филиппова С. Н.¹,
Молчан О. В.², Логвина А. О.¹, Глушакова Д. Ю.¹,
Спиридович Е. В.³, Решетников В. Н.³**

¹ Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, yurin@bsu.by

² Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

³ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме. На основе листовых, стеблевых и корневых эксплантов создана биотехнологическая коллекция каллусных культур лекарственных растений *Althaea officinalis* L., *Vinca major* L., *Vinca minor* L., *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Trigonella foenum-graecum* L., *Salvia officinalis* L., *Aerva lanata* (L.) Juss., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench, включающая 20 гетеротрофных и фотомиксотрофных линий. Для ряда линий приводится содержание отдельных классов вторичных метаболитов, которые могут быть использованы для фармакологических целей. Установлены наиболее оптимальные режимы беспересадочного культивирования и разработана общая схема процесса депонирования.

Collection of callus cultures of medicinal plants. Yurin V. M., Ditchenko T. I., Filipava S. N., Molchan O. V., Lohvina H. O., Spiridovich E. V., Reshetnikov V. N. **Summary.** A biotechnological collection of 20 heterotrophic and photomixotrophic lines of leaf, stem and root callus cultures of medicinal plants of the species *Althaea officinalis* L., *Vinca major* L., *Vinca minor* L., *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Trigonella foenum-graecum* L., *Salvia officinalis* L., *Aerva lanata* (L.) Juss., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench has been created. The content of individual classes of pharmacologically valuable secondary metabolites contained in the callus lines is presented. The most optimal modes of without-transplantation cultivation of the calli were established. A general scheme of the depositing process was developed.

Сохранение ценных генотипов лекарственных растений является основой не только изучения процессов морфогенеза и регенерации в культуре, но важным биотехнологическим приемом получения ценных фармакологически активных субстанций [1].

Мало того, что некоторые редкие виды неспособны к выживанию в условиях интродукции [2,3], то в ряде случаев при работе с тропическими растениями более экономически оправданным, а, в ряде случаев, единственным приемом получения лекарственных препаратов, является их введение в культуру *in vitro*.

Создание банка каллусных и суспензионных культур как раз и направлено на решение указанных проблем. Важная особенность культивируемой популяции клеток — ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза.

При создании банка культур *in vitro* первостепенное значение приобретают приемы удлинения сроков субкультивирования. Одним из приемов является «депонирование» — сохранение коллекций без частых пересадок, которые позволяют существенно удлинить период между пересадками культур. Это связано с тем, что периодическое субкультивирование клеточных

культур растений трудоемко и требует значительных затрат, как на выполнение работ, так и на приготовление питательных сред для культивирования.

Для создания коллекции каллусных культур лекарственных растений с целью их использования в качестве продуцентов фармакологических субстанций природного происхождения были выбраны следующие объекты: алтей лекарственный (*Althaea officinalis* L.), барвинок большой (*Vinca major* L.), барвинок малый (*Vinca minor* L.), катарантус розовый (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), эрва шерстистая (*Aerva lanata* (L.) Juss.), эхинацея бледная (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.), эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) [4–6]. Каллусные культуры были инициированы из эксплантов различного происхождения (листового, стеблевого, корневого). Для культивирования использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов. В качестве ауксинов питательные среды включали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, 1-нафтилуксусную кислоту либо β -индолил-3-уксусную кислоту, в качестве цитокининов — кинетин либо 6-бензиламинопурин. Культивирование каллусов осуществлялось в темноте в условиях термостата при температуре 25°C, либо в условиях фитостата при интенсивности освещении — 150 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и фотопериоде — 16/8 часов свет/темнота.

В исследованиях по депонированию каллусных культур объектами служили каллусные ткани алтея лекарственного (*Althaea officinalis* L.), катарантуса розового (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), эхинацеи бледной (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.), эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), барвинка малого (*Vinca minor* L.). Для увеличения интервала между субкультивированиями каллусных тканей использовали однокомпонентное и сочетанное действия пониженной температуры +10°C, осмотического агента D-маннита в концентрации 5% и ретарданта хлорхолинхлорида в концентрации 100 мг/л. Контроль за физиологическим состоянием культур в условиях депонирования производили на основе учета индекса роста, содержания сухого вещества, дегидрогеназной активности клеток.

Биохимический анализ исследуемых каллусных культур включал количественное определение содержания суммы фенольных соединений (ФС), флавоноидов, стероидных сапонинов и алкалоидов, а также некоторых индивидуальных соединений (алкалоиды — серпентин и аймалицин).

В водно-спиртовых экстрактах из каллусных культур *Althaea officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, *Salvia officinalis*, *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* содержание ФС анализировали на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина-Дениса. Измерение оптической плотности проб проводили с помощью спектрофотометра Cary Bio 50 при 720 нм. Для каллусных культур *Althaea officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, *Salvia officinalis* содержание ФС (мг/г_{сух. в.}) определяли в пересчете на феруловую кислоту, для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* — в пересчете на галловую кислоту. В ходе количественного анализа содержания ФС в экстрактах из каллусных культур *Trigonella foenum-graecum* L. использовали метод Фолина-Чокальтеу и выражали содержание ФС в мг/г сухой массы в эквиваленте галловой кислоты [7]. Измерение оптической плотности проб проводили с помощью спектрофотометра Cary Bio 50 при длине волны 750 нм.

Общее содержание стероидных сапонинов находили с использованием спектрофотометрической методики [8] и выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте диосгенина.

Флавоноиды определяли в водно-спиртовых экстрактах каллусных культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* на основе реакции с 0,05 моль/л раствором хлорида алюминия в 96% этаноле [9]. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на фотоколориметре при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения использовали 0,05 моль/л раствор хлорида алюминия в этаноле. Содержание суммы флавоноидов определяли в пересчете на гликозиды квертецина.

Выделение алкалоидов индольного ряда из каллусных культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* проводили согласно методике, описанной ранее [10]. Для определения суммы алкалоидов сухой остаток взвешивали. Для анализа аймалицина и серпентина сухой остаток растворяли в 1 мл метанола и использовали для хроматографического анализа [11].

В результате выполнения работы оптимизированы технологии получения каллусных культур 9 видов лекарственных растений из эксплантов листового либо корневого происхождения. Для ряда видов (*Catharanthus roseus*, *Echinacea purpurea*, *Trigonella foenum-graecum*, *Vinca minor*) получены отдельные линии каллусных тканей в зависимости от типа исходного экспланта, а также условий культивирования. Перечень объектов коллекции из 20 линий каллусных культур представлен в табл. 1.

Таблица 1

Перечень полученных каллусных культур

№	Вид	Тип каллусной культуры
1	<i>Aerva lanata</i>	ГКА _{lan} -0 — гетеротрофная каллусная культура эрвы шерстистой листового происхождения
2	<i>Althaea officinalis</i>	ГКА _{of} -0 — гетеротрофная каллусная культура алтея лекарственного розового листового происхождения
3	<i>Catharanthus roseus</i>	ГК _{Cros} -0 — гетеротрофная каллусная культура катарантуса розового листового происхождения
4	<i>Catharanthus roseus</i>	ФК _{Cros} -1 — фотомиксотрофная каллусная культура катарантуса розового листового происхождения, продуцирующая хлорофиллы
5	<i>Catharanthus roseus</i>	ФК _{Cros} -2 — фотомиксотрофная каллусная культура катарантуса розового листового происхождения, продуцирующая антоцианы
6	<i>Echinacea pallida</i>	ГК _{Epal} -0 — гетеротрофная каллусная культура эхинацеи бледной листового происхождения
7	<i>Echinacea purpurea</i>	ГК _{Epur} -0 — гетеротрофная каллусная культура эхинацеи пурпурной листового происхождения
8	<i>Echinacea purpurea</i>	ГК _{Epur} -1 — гетеротрофная каллусная культура эхинацеи пурпурной корневого происхождения
9	<i>Salvia officinalis</i>	ГКС _{of} -0 — гетеротрофная каллусная культура шалфея лекарственного листового происхождения
10	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ГКТ _{fgr} -0 — гетеротрофная каллусная культура листового происхождения пажитника греческого озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ
11	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ГКТ _{fgr} -1 — гетеротрофная каллусная культура стеблевого происхождения пажитника греческого озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ
12	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ГКТ _{fgr} -2 — гетеротрофная каллусная культура листового происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovari 4
13	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ГКТ _{fgr} -3 — гетеротрофная каллусная культура стеблевого происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovari 4
14	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ФКТ _{fgr} -0 — фотомиксотрофная каллусная культура листового происхождения пажитника греческого озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ
15	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ФКТ _{fgr} -1 — фотомиксотрофная каллусная культура стеблевого происхождения пажитника греческого озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ
16	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ФКТ _{fgr} -2 — фотомиксотрофная каллусная культура листового происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovari 4
17	<i>Trigonella foenum graecum</i>	ФКТ _{fgr} -3 — фотомиксотрофная каллусная культура стеблевого происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovari 4
18	<i>Vinca major</i>	ГК _{Vmaj} -0 — гетеротрофная каллусная культура барвинка большого листового происхождения
19	<i>Vinca minor</i>	ГК _{Vmin} -0 — гетеротрофная каллусная культура барвинка малого листового происхождения
20	<i>Vinca minor</i>	ГК _{Vmin} -1 — гетеротрофная каллусная культура барвинка малого листового происхождения, продуцирующая повышенные уровни фенольных соединений

Анализ биохимического состава ряда приведенных выше линий каллусных культур указывает на их высокую фармакологическую ценность (Табл. 2). Так, например, как видно из табл. 2, в исследуемых каллусных линиях накапливается значительное количество биологически-активных соединений фенольной природы, в частности — флавоноидов. Данные соединения играют важнейшую роль как антиоксиданты в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в клетках живых организмов благодаря снижению концентрации свободно-радикальных форм метаболитов.

Кроме широкого спектра фенольных соединений в каллусных линиях *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, присутствуют алкалоиды индольного ряда, характеризующиеся высокой биологической активностью. Особую фармакологическую значимость среди алкалоидов исследуемых каллусных линий имеют аймалицин, проявляющий антиаритмическое действие [12], а также серпентин, обладающий гипотензивным, седативным и транквилизирующим эффектами. Кроме того, исследования последних лет показали возможность применения серпентина при лечении болезни Альцгеймера и (или) миостении [13].

Присутствие широкого класса фенольных соединений в каллусных линиях *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* наряду с алкалоидами может оказывать более мягкий терапевтический эффект благодаря возможной антиоксидантной активности таких сопутствующих метаболитов, как фенолы, которые могут усиливать, пролонгировать фармакологическое действие и, возможно, понижать токсичность основных лекарственных препаратов — алкалоидов.

Нужно отметить также, что фотомиксотрофные каллусные линии характеризовались повышенной продуктивностью ценных вторичных метаболитов, в частности фенольных соединений и алкалоидов. Так, например, содержание флавоноидов в фотомиксотрофной каллусной линии ФКCros-2 превышало в 13,6 раза накопление вышеуказанных соединений в гетеротрофной каллусной линии ГКCros-0. Такая же тенденция была отмечена и для накопления общей суммы алкалоидов *Catharanthus roseus*, а также для алкалоида серпентина. Таким образом, свет в большинстве случаев выступает как стимулирующий фактор биосинтеза фармакологически-ценных вторичных метаболитов (ВМ). Кроме того, известно, что свет индуцирует морфогенез каллусных тканей, в частности, развитие флоэмных и ксилемных клеток [13]. Следовательно, свет является индуцирующим фактором для стимуляции процессов дифференцировки в каллусных тканях, включая активацию определенных генов, не экспрессирующихся в его отсутствии [14; 15].

Создание коллекции потребовало разработки способа удлинения сроков субкультивирования. С этой целью нами проведено депонирование культур. Для каждой из культур подобраны наиболее оптимальные режимы беспересадочного культивирования в течение от 65 до 95 сут, обеспечивающие практически полное восстановление их ростовой активности после переноса в стандартные условия.

Для депонирования *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis* рекомендовано использование гипотермии, а в случае *Althaea officinalis* — наряду с гипотермией сочетанное воздействие пониженной температуры и D-маннита. Для *Catharanthus roseus* среди исследуемых приемов депонирования каллусных клеток наиболее оптимальным методом является включение D-маннита в среду инкубации, тогда как для каллусных клеток *Vinca minor* — однокомпонентное воздействие D-маннита либо использование его в сочетании с гипотермией. Депонирование каллусной культуры *Trigonella foenum-graecum* предлагается осуществлять в условиях сочетанного действия D-маннита и пониженной температуры.

На основании установленных закономерностей разработана общая схема процесса депонирования каллусных культур лекарственных растений, включающая 3 этапа. На первом этапе культуры поддерживаются в стандартных условиях выращивания *in vitro* на основе регулярного субкультивирования. Обязательной процедурой при этом является определение оптимальной продолжительности ростового цикла и периодический анализ ростовой активности культуры, а также характеристика биосинтетического потенциала по уровням содержания целевых метаболитов. Задача второго этапа (депонирование) — изменение условий инкубации культуры с целью минимизации роста и увеличения продолжительности беспересадочного куль-

тивирования. Через определенные интервалы времени, как минимум раз в месяц, проводится контроль за физиологическим состоянием культуры в условиях депонирования (учет прироста биомассы, жизнеспособности и др.). На третьем этапе осуществляют перенос объекта в стандартные условия культивирования — рекультивирование. Он включает оценку последствий беспересадочного культивирования на рост культуры и ее способность к синтезу ВМ, обладающих фармакологической активностью.

Таблица 2

Содержание отдельных классов и индивидуальных соединений вторичных метаболитов (ВМ) в каллусных культурах

Каллусная культура	Тип клеточной линии	ВМ	Содержание, мг/г сух. в.
<i>Althaea officinalis</i>	ГКАof-0	Фенольные соединения	9,42±0,43
<i>Salvia officinalis</i>	ГКСof-0	-/-	7,69±0,26
<i>Echinacea purpurea</i>	ГКЕpur-0	-/-	14,91±0,17
<i>Echinacea pallida</i>	ГКЕpal-0	-/-	7,14±0,43
<i>Catharanthus roseus</i>	ГКСros-0	-/-	40,22±1,13
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-1	-/-	71,24±1,61
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-2	-/-	134,64±3,14
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-0	-/-	4,83±0,59
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-1	-/-	5,59±0,62
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-2	-/-	8,74±0,42
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-3	-/-	6,27±0,71
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-0	-/-	6,99±0,38
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-1	-/-	5,61±0,39
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-2	-/-	7,63±0,51
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-3	-/-	7,08±0,32
<i>Vinca minor</i>	ГКVmin-0	-/-	56,36±1,36
<i>Catharanthus roseus</i>	ГКСros-0	Флавоноиды	6,82±0,21
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-1	-/-	9,9±0,38
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-2	-/-	30,37±0,64
<i>Vinca minor</i>	ГКVmin-0	-/-	4,3±0,23
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-0	Стероидные сапонины	3,10±0,51
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-1	-/-	4,02±0,42
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-2	-/-	12,95±1,19
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ГКТfgr-3	-/-	3,46±0,48
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-0	-/-	10,69±0,65
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-1	-/-	14,94±1,25
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-2	-/-	16,27±1,68
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	ФКТfgr-3	-/-	32,0±16,24
<i>Catharanthus roseus</i>	ГКСros-0	Алкалоиды	3,69±0,57
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-1	-/-	4,16±0,43
<i>Vinca minor</i>	ГКVmin-0	-/-	1,52±0,14
<i>Catharanthus roseus</i>	ГКСros-0	Аймалицин	0,28±0,04
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-1	-/-	0,08±0,02
<i>Catharanthus roseus</i>	ГКСros-0	Серпентин	0,98±0,15
<i>Catharanthus roseus</i>	ФКСros-1	-/-	2,26±0,14

Список литературы

1. Филиппова С. Н., Дитченко Т. И., Логвина А. О., Юрин В. М. Разработка эффективных способов депонирования каллусных культур ценных лекарственных растений. Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2015, т. 10, ч. 1, с. 211–226.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Андреев Л. Н., Горбунов Ю. Н. Сохранение редких и исчезающих растений *in situ*: достижения и проблемы. Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии: Матер. Междунар. конф., Москва, 2000. — С. 19–23.
4. Lohvina N. O., Makai S., Ditchenko T. I., Reshetnikov V. N., Spiridovich E. V., Yurin V. M. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties. Acta Agronomica Óváriensis, 2012, v. 54, iss. 2, p. 29–37.
5. Логвина А. О., Юрин В. М. Получение фотомиксотрофных линий каллусных культур *Trigonella foenum-graecum*. Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Сб. ст. в 2 ч. Ч. 2, Минск, 2014, с. 200–202.
6. Логвина А. О. Физиолого-биохимические характеристики клеточных культур *Trigonella foenum-graecum*: дис. канд. биол. наук: 03.01.05. Минск, 2015, 239 с.
7. Slinkard K., Singleton V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture, 1977, v. 28, p. 49–55.
8. Vaccou J. C., Lambert F., Sauvaire Y. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. Analyst, 1977, v. 102, p. 458–465.
9. Запрометов М. Н. Биохимические методы анализа растений. Москва: Иностранная литература, 1960, 592 с.
10. Ромашко, С. Н., Червяковский Е. М., Янцевиц А. В., Молчан О. В., Юрин В. М. Содержание винкамина и идентификация серпентин — и аймалицин-подобных соединений в интродуцированном в Беларуси Барвинке малом. Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем», 2011, т. 6, с. 62–69.
11. Uniyal G. C. Symmetry C₁₈ column: a better choice for the analysis of indole alkaloids of *Catharanthus roseus*. Phytochemical Analysis, 2001, v.12, p. 206–210.
12. Facchini P. J. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering application. Phytochemistry, 2000, v. 54, p. 121–138.
13. Pereira D. M. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. Phytomedicine, 2010, v. 8, p. 646–652.
14. Zhao J. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Plant Growth Regulation, 2001, v. 33, p. 43–49.
15. Zhao J. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. Phytochemistry Reviews, 2007, v. 6, p. 435–457.