

УДК 582.675.1.086:547.91

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ОЛЕАНДРА ОБЫКНОВЕННОГО (*NERIUM OLEANDER* L.) И ИХ АНАЛИЗ НА СОДЕРЖАНИЕ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Чмелева С.И., Бугара А.М., Омельченко А.В., Якимова О.В.

Исследованы особенности индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного (*Nerium oleander* L.). Подобраны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга для получения и пассирования каллусных культур. Химический анализ каллусных культур выявил присутствие в них фракций сердечных гликозидов, характерных для интактных растений.

Ключевые слова: *Nerium oleander* L., каллусная культура, сердечные гликозиды.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений биотехнологии является получение веществ вторичного метаболизма на основе культивируемых *in vitro* клеток растений. Разработка таких биотехнологий базируется на исследовании закономерностей каллусогенеза и накопления вторичных метаболитов в клеточных культурах. Среди веществ вторичного метаболизма значительный интерес представляют различные гликозиды, проявляющие широкий спектр фармакологического действия.

Значимость гликозидов как биологически активных соединений вызывает интерес к их изучению в клеточных культурах. Гликозиды были обнаружены в каллусных и суспензионных культурах целого ряда видов растений [1 – 6]. При этом удалось показать, что в каллусных и суспензионных культурах могут накапливаться гликозиды, аналогичные гликозидам интактных растений [7, 8]. Установленные факты дают основание предполагать, что гликозиды могут быть обнаружены в культивируемых клетках и других, пока не исследованных в этом отношении видов.

Олеандр обыкновенный (*Nerium oleander* L.) содержит гликозиды сердечного ряда, представляющие интерес для фармакологии [9]. До настоящего времени в известной нам литературе не удалось найти сведений о получении клеточных культур олеандра обыкновенного, содержащих сердечные гликозиды. В этой связи целью настоящей работы являлось определение условий получения каллусных культур и их анализ на присутствие сердечных гликозидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили вегетативные органы олеандра обыкновенного. В качестве инициальных эксплантов использовали сегменты зрелых листьев и узлы стебля. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили ступенчато сначала 70 % этанолом (2-5 сек.), затем 100% брадофеном (3 мин) и 15 % перекисью водорода (5 мин) с последующей промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Экспланты культивировали на агаризованных модифицированных питательных сред Мурасиге и Скуга (МС) [10], дополненных ИУК (индолил-3-уксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфенилуксусная кислота), кинетином и БАП (6-бензиламинопурин). Полученный первичный каллус субкультивировали на питательные среды того же состава. Цикл выращивания культур составлял 90-120 суток. В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие 15 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов определенного типа в 3-х кратной повторности. Экспланты культивировали при температуре 23-25⁰С, освещенности 4-5 клк и 16-часовом фотопериоде. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных.

Для химического анализа на содержание сердечных гликозидов использовали каллусные культуры 1-го и 2-го пассажа, индуцированные из сегментов зрелых листьев. Культуры, находящиеся в стационарной стадии роста, извлекали из культуральных пробирок, высушивали при комнатной температуре, а затем измельчали в ступке с 80 % изопропанолом. Смесь нагревали на водяной бане до температуры кипения изопропанола. Для определения наличия сердечных гликозидов на хроматографические пластинки Sorbfil наносили по 0,05 мл смеси в потоке тёплого воздуха. Для разделения гликозидов на фракции использовали систему растворителей 25% трихлоруксусная кислота: 96% этанол: 3% трихлорамин. Пластины нагревали при температуре 100-120⁰С. Детектирование пятен гликозидов проводили в УФ-свете по специфической флуоресценции. Контролем служили водно-спиртовые экстракты из листьев и стеблей олеандра обыкновенного [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного показали, что этот процесс в значительной степени зависит от состава питательной среды и практически не зависит от типа экспланта (табл. 1). Максимальная частота каллусообразования (94-95%) обнаруживалась на питательной среде МСVIII, дополненной 0,5 мг/л ИУК, 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. Высокая частота каллусообразования (81-86%) выявлена на питательной среде МСVI, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования была достоверно снижена и значение данного показателя не превышало 61%.

Таблица 1.

Частота каллусообразования в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного в зависимости от состава питательной среды и типа экспланта

Вариант питательной среды	Типы и концентрации фитогормонов в питательной среде, мг/г				Типы эксплантов	Частота каллусообразования, %
	2,4-Д	ИУК	БАП	кинетин		
МСI	2,0	–	–	0,5	Сегменты зрелых листьев	40,0±0,3
					Узлы стеблей	39,0±0,7
МСII	2,0	–	0,5	–	Сегменты зрелых листьев	59,0±0,3
					Узлы стеблей	56,0±0,5
МСIII	2,0	0,5	–	0,5	Сегменты зрелых листьев	52,0±0,3
					Узлы стеблей	50,0±0,4
МСIV	2,0	0,5	0,5	–	Сегменты зрелых листьев	61,0±0,3
					Узлы стеблей	61,0±0,3
МСV	2,0	–	0,5	–	Сегменты зрелых листьев	38,0±0,2
					Узлы стеблей	37,0±0,8
МСVI	2,0	–	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	86,0±0,25
					Узлы стеблей	81,0±0,4
МСVII	1,0	–	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	49,0±0,4
					Узлы стеблей	48,0±0,5
МСVIII	2,0	0,5	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	94,0±0,15
					Узлы стеблей	95,0±0,24

При введении эксплантов в условия *in vitro* первые признаки каллусогенеза обнаруживались, как правило, через 1-2 недели культивирования. Каллус, индуцированный из эксплантов разного типа, имел светлую, слегка желтоватую окраску, характеризовался плотной консистенцией и невысокой интенсивностью роста. При визуальном анализе каллусных культур не были выявлены признаки морфогенеза, каллус отличался относительной гомогенностью структуры.

При субкультивировании каллусных культур они сохраняли невысокую интенсивность роста и по мере достижения стационарной фазы приобретали слегка буроватую окраску и более плотную консистенцию.

Цитологический анализ пассируемых каллусных культур, индуцированных из эксплантов разного типа, показал, что они состояли из клеток различных размеров и формы. При этом количество клеток определенных типов было различным в зависимости от состава питательной среды (рис. 1). Так, каллусные культуры 2-го пассажа, индуцированные из сегментов листьев, на средах МСIV и МСVIII различались соотношением клеток различных типов.

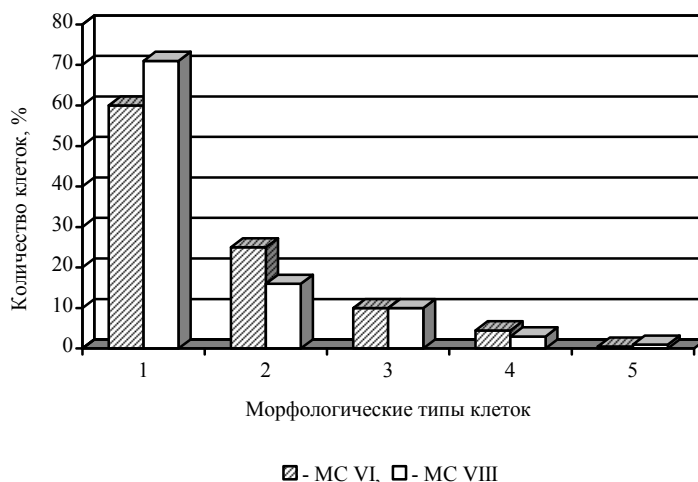


Рис. 1. Количество морфологических типов клеток в каллусных культурах олеандра обыкновенного на питательных средах различного состава: 1 – округлые; 2 – округлые с включениями; 3 – удлиненные; 4 – овальные; 5 – гигантские.

Однако в обоих случаях в каллусных культурах преобладали клетки округлой формы, количество которых на питательной среде МСVI составляло 60%, а на среде МСVIII 71%.

При анализе интактного материала олеандра обыкновенного было выявлено 9 основных фракций сердечных гликозидов, из которых – пять фракций гитоксигенина (голубые хроматографические зоны), две фракции дигитоксигенина (хроматографические зоны золотистого цвета) и две фракции дигоксигенина (хроматографические зоны стального цвета). При этом в стеблях обнаружено четыре фракции, из них три – гитоксигенина (А) и одна дигитоксигенина (В), а в листьях – три фракции дигоксигенина (С) (рис. 2).

Химический анализ каллусных культур 2-го пассажа, 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 среду MCVIII, содержащей 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л ИУК, 0,5 мг/л кинетин, 0,5 мг/л БАП.

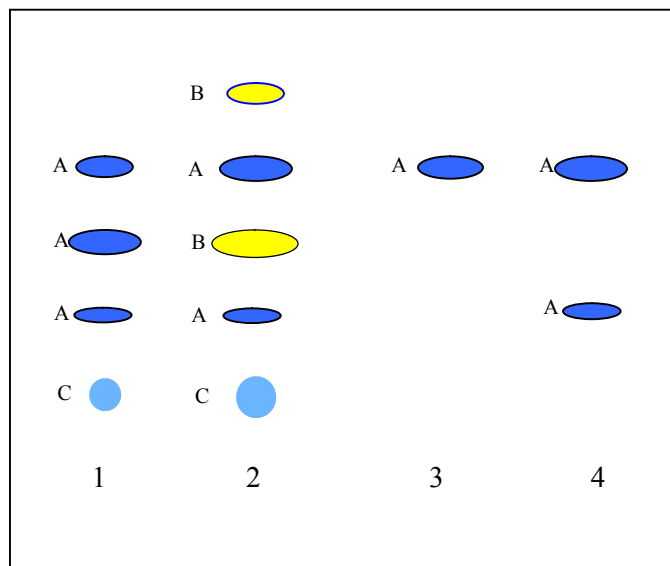


Рис. 2. Схема распределения фракций сердечных гликозидов из органов интактных растений и каллусных культур олеандра обыкновенного: 1 – стебли; 2 – листья; 3 – каллусная культура на питательной среде MCVI; 4 – каллусная культура на питательной среде MCVIII; А – гитоксигенин; В – дигитоксигенин; С – дигоксигенин.

Анализ каллусных культур на содержание сердечных гликозидов показал, что они отличались от интактных органов по количеству фракций сердечных гликозидов. При этом количество выявленных фракций зависело от состава питательной среды.

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред для индукции каллусогенеза и пассирования каллусных культур олеандра обыкновенного. Химический анализ каллусных культур показал присутствие в них различных фракций сердечных гликозидов. Изложенные результаты подтверждают уже известные факты о возможности получения клеточных культур растений, накапливающих сердечные гликозиды. Так, в последние годы удалось получить экспериментальные доказательства о содержании различных гликозидов в каллусных культурах *Ginkgo biloba*, *Atroгене sibirica*, *Dioscorea deltoidea*, *Panax japonicus*. При этом было показано, что синтез гликозидов в культивируемых клетках зависит от состава питательной среды, типа экспланта и возраста культуры [1, 2, 4, 5].

Наши исследования впервые показали возможность получения каллусных культур олеандра обыкновенного, содержащих сердечные гликозиды. Эти результаты открывают перспективы дальнейших исследований, направленных на селективный отбор и получение каллусных и суспензионных культур, обладающих

повышенной продуктивностью в отношении биосинтеза указанных биологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза и получения каллусных культур из эксплантов вегетативных органов олеандра обыкновенного.
2. Исследованы цитоморфологические особенности каллусных культур олеандра обыкновенного и показана вариабельность каллусных клеток по форме и размерам.
3. Установлено, что каллусные культуры из эксплантов зрелых листьев и узлов стеблей олеандра обыкновенного содержат сердечные гликозиды, характерные для интактного растения.

Список литературы

1. Синтез сапонинов в культуре ткани *Atroгене sibirica* L. / [Р. А. Карночук, В. Ю. Дорофеев, И. В. Шимова и др.] // 4-тый съезд общества физиологов растений России в рамках международной конференции «Физиология растений наука 3-его тысячелетия»: тезисы докладов (Москва, 4–9 октября 1999 г.). – М., 1999. – Т.2. – С. 556.
2. Васильев И. С. Стероидные гликозиды из культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность / И. С. Васильев, В. А. Пасешниченко // Успехи биол. химии. – 2000. – Т.40. – С. 153–204.
3. Карпов П. А. Возможности использования культуры тканей *Yucca macrocara* для получения стероидных гликозидов / П. А. Карпов // Доповіді АН України. – 2000. – № 9. – С. 180–85.
4. Чайко А. Л. Культура клеток женьшеня японского *Panax japonicus* (var. *repens*): получение каллусной и суспензионной культур, оптимизация роста и анализ панаксозидов / А. Л. Чайко, О. В. Решетняк, И. Е. Куличенко // Биотехнология. – 1999. – № 6. – С. 51–55.
5. Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* L. and the identification of the ginkgolides / [Zheng Yu., Rongmin Yu., Yao Xin. et al.] // J. Sheyang Pharm Univ. – 1999. – V.16, № 1. – С. 10–15.
6. Носов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А. М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М. : Наука, 1991. – С. 5–20.
7. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
8. Пат. 24538, МПК С12N5/04. Спосіб одержання калусної тканини ломиносу виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) / С. І. Чмелева, О. М. Бугара, А. І. Сідякин. – заявник і патентовласник Тавр. нац. ун-т. – № u200613099 ; заявл. 11.12.06 ; опубл. 10.07.07., Бюл. № 10.
9. Орлов Б. Н. Ядовитые животные и растения СССР : справочное пособие для студентов вузов по спец. «Биология» / Б. Н. Орлов, Д. Б. Гелашвили, А. К. Ибрагимов. – М. : Высшая школа, 1990. – 272 с.
10. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 13. – p. 473–497.
11. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. – М. : Мир, 1980. – 621 с

Чмелева С.И., Бугара О.М., Омельченко О.В., Якимова О.В. Одержання калусних культур олеандра звичайного (*Nerium oleander* L.) та їх аналіз на вміст серцевих гликозидів // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т.22 (61). – № 2. – С. 145-151.

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ОЛЕАНДРА ОБЫКНОВЕННОГО

Досліджені особливості індукції калусогенеза в культурі вегетативних органів олеандра звичайного (*Nerium oleander* L.). Підібрані модифікації поживних середовищ Мурасіге і Скуга для отримання і пасирування калусних культур. Хімічний аналіз калусних культур виявив присутність в них фракцій серцевих глікозидів, характерних для інтактних рослин.

Ключові слова: *Nerium oleander* L., калусна культура, серцеві глікозиди.

Chmeleva S.I., Bugara A.M., Omel'chenko, A.V., Yakimova O.V. Getting callus cultures of ordinary oleander (Nerium oleander L.) and analysis of cardiac glycosides on the content // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 2. – P.145-151.

Features of callus induction in the culture of the vegetative organs of *Nerium oleander* L. were investigated. Selected Murashige and Skug nutrient media modified for obtaining and passage callus cultures. Chemical analysis of callus cultures revealed the presence of fractions of cardiac glycosides, which are typical for the intact plants.

Keywords: *Nerium oleander* L., callus culture, cardiac glycosides.

Поступила в редакцію 07.05.2009 з.