

УДК 582.675.1.086.83.:547.91

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ *FATSHEDERA LIZEI* – ПРОДУЦЕНТЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Чмелева С.И., Брановицкая Т.Ю., Панов Д.А., Омельченко А.В., Бугара И.А.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: cmelevasiv@ukr.net

Исследованы особенности индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов *Fatshedera lizei*. Подобранны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга для каллусогенеза. Пассируемый каллус отличался высоким уровнем морфологической гетерогенности. Получены экспериментальные доказательства о присутствии в каллусных культурах различных фракций тритерпеновых гликозидов, аналогичных интактному растению.

Ключевые слова: *Fatshedera lizei*, каллусная культура, тритерпеновые гликозиды.

ВВЕДЕНИЕ

Возможности и перспективы использования культивируемых клеток растений для получения биологически активных веществ уже давно привлекали исследователей в области биотехнологии. В последние годы в связи с ограниченностью природного лекарственного сырья данное направление является актуальным и перспективным [1, 2]. Разработка таких технологий заключается в исследованиях закономерностей каллусогенеза и накоплении вторичных метаболитов в клеточных культурах. Среди веществ вторичного метаболизма значительный интерес представляют различные гликозиды, проявляющие широкий спектр фармакологического действия.

Представители семейства аралиевых являются источниками ценных биологически активных веществ – гликозидов, которые проявляют ярко выраженное адаптогенное, антибактериальное, противогрибковое, противокашлевое действие (женьшень, аралия маньчжурская, заманиха высокая, элеутерококк колючий, лимонник китайский, плющ обыкновенный) [3].

Fatshedera lizei – гибрид, полученный при скрещивании видов *Fatsia* L. и *Hedera* L., которые в настоящий момент являются достаточно исследованными культурами [4, 5]. При этом публикации, касающиеся получения каллусных культур фатсхедеры в научной печати отсутствуют.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили вегетативные органы *Fatshedera lizei*, культивируемые в условиях закрытого грунта. Растения содержали в вегетационных сосудах объемом 5 л, в субстрате, состоящем из смеси почвы, песка, керамзита и

перлита. В качестве инициальных эксплантов использовали листовые черешки и фрагменты ювенильных листьев. Для соблюдения условий асептики работу по введению в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили гипохлоридом натрия (5 мин) с последующей промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Экспланты культивировали на агаризованных модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС) [6], дополненных ИУК (индолил-3-уксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфенилуксусная кислота), 6-БАП (6-бензиламинопурин), кинетином и аскорбиновой кислотой в различных концентрациях. 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 30 эксплантов определенного типа в 3-х кратной повторности. Экспланты культивировали при температуре 23-25°C, освещенности 4-5 клк и 16-часовом фотопериоде. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных [7, 8].

Для химического анализа на содержание тритерпеновых гликозидов каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, извлекали из культуральных сосудов 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», 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% параоксибензальдегида с последующим нагреванием хроматограмм при 100-120°C. В качестве контроля использовали водно-спиртовые экстракты из листьев *Fatshedera lizei* [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов *Fatshedera lizei* показали, что этот процесс в значительной степени зависел от состава питательной среды и не зависел от типа используемого экспланта (табл.1). Во всех исследуемых вариантах с применением экзогенных фитогормонов наблюдался каллусогенез, при этом максимальная частота (95,0±2,1) обнаруживалась на питательной среде МС7, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП и на среде МС3, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ИУК.

Высокая частота каллусообразования как для ювенильных листьев, так и для листовых черешков (83,4-87,9 %) нами была установлена и на питательной среде МС6, содержащей 1,0 мг/л ИУК, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования была достоверно снижена, по сравнению с МС3, МС 6 и МС 7.

Таблица 1.

Зависимость частоты каллусообразования от типа экспланта и состава питательной среды

Тип экспланта	Питательная среда	Концентрация фитогормонов в питательной среде, мг/л					Частота каллусообразования, %
		2,4-Д	6-БАП	кинетин	ИУК	аскорбиновая кислота	
Фрагменты ювенильных листьев	МС1	-	1,0	0,1	0,5	-	87,4±5,8
Фрагменты листовых черешков							51,2±3,5
Фрагменты ювенильных листьев	МС2	2,0	0,1	1,0	-	-	80,1±3,3
Фрагменты листовых черешков							55,2±2,7
Фрагменты ювенильных листьев	МС3	2,0	0,5	1,0	0,5	-	95,2±2,1
Фрагменты листовых черешков							88,3±4,3
Фрагменты ювенильных листьев	МС4	2,0	1,0	0,5	-	1,0	73,4±3,7
Фрагменты листовых черешков							42,1±3,2
Фрагменты ювенильных листьев	МС5	3,0	1,0	1,0	-	1,0	34,7±4,4
Фрагменты листовых черешков							25,5±1,7
Фрагменты ювенильных листьев	МС6	-	0,5	0,5	1,0	-	83,4±5,7
Фрагменты листовых черешков							87,9±4,2
Фрагменты ювенильных листьев	МС7	2,0	0,5	0,5	-	-	95,0±2,1
Фрагменты листовых черешков							94,0±2,1
Фрагменты ювенильных листьев	МС8	-	-	-	-	-	0
Фрагменты листовых черешков							0

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

Каллус, индуцированный из эксплантов разного типа, имел светлую, слегка желтоватую окраску, характеризовался плотной консистенцией и невысокой интенсивностью роста (рис.1).

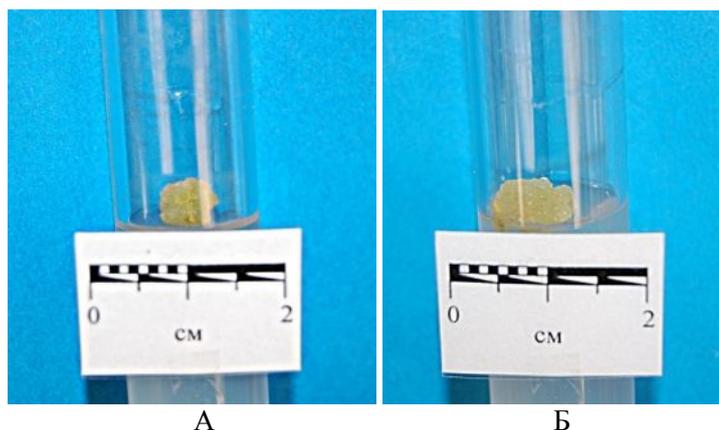


Рис.1. Первичная каллусная ткань *Fatshedera lizei*, полученная из листовых черешков (А) и фрагментов ювенильных листьев (Б).

При визуальном анализе каллусных культур нами не были выявлены признаки морфогенеза, каллус отличался относительной гомогенностью структуры.

После 45 суток культивирования каллус пересаживали на свежую питательную среду. Для пассирования каллуса, индуцированного в культуре фрагментов ювенильных листьев и фрагментов листовых черешков использовали среды, на которых частота каллусообразования была наибольшей (см. табл. 1).

Наши исследования показали, что наименьший прирост биомассы каллуса (100%) наблюдался на модифицированной питательной среде, дополненной 1,0 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л кинетином и 0,5 мг/л ИУК. С увеличением концентрации кинетина в питательной среде прирост биомассы каллуса возрастал и на питательной среде с 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л кинетином и 0,5 мг/л ИУК достигал наибольшего значения – 200% (табл. 2).

Таблица 2
Влияние гормонального состава питательной среды на прирост биомассы каллуса

Вариант питательной среды	Концентрация фитогормонов в питательной среде, мг/л					Прирост биомассы, %
	2,4-Д	6-БАП	кинетин	аскорбиновая кислота	ИУК	
МС1	-	1,0	0,1	-	0,5	100
МС2	2,0	0,1	1,0	-	-	150
МС3	2,0	0,5	1,0	-	0,5	200

Цитологическое исследование первичного и пассируемого каллуса *Fatshedera lizei* проводили на временных давленных препаратах, окрашенных метиленовым синим. Гистологическая дифференциация клеток была выражена слабо. Пассируемый каллус отличался значительной вариабельностью клеток по размерам

и форме. В нем четко дифференцировались клетки меристематического и паренхимного типов (рис. 2). Меристематические клетки отличались небольшими размерами и располагались локальными скоплениями. Они имели изодиаметрическую форму, крупное ядро и ядрышко. Ядрышко занимало значительную часть объема ядра и было окружено светлой зоной кариоплазмы. Цитоплазма слабо вакуолизированна.

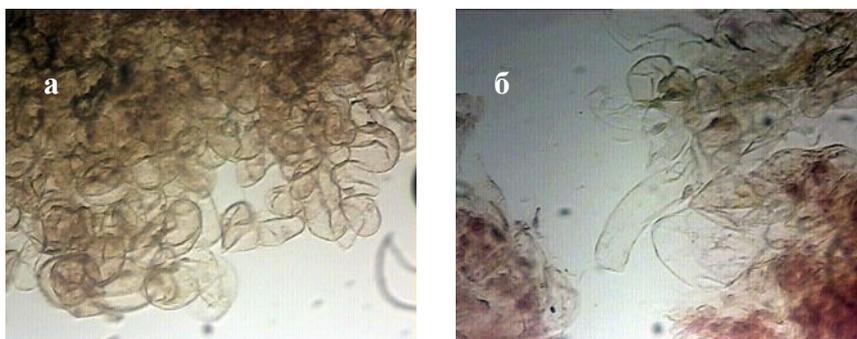


Рис. 2. Клетки каллусной ткани *Fatshedera lizei*: а – меристематические, б – паренхимные.

Округлые клетки имели хорошо выраженной ядро и отличались слабой вакуолизацией цитоплазмы. В удлинённых паренхимных клетках ядро визуально не дифференцировано, располагались они, как правило, локально, в местах скопления клеток меристематического типа.

При химическом анализе интактного материала *Fatshedera lizei* было выявлено 8 различных фракций тритерпеновых гликозидов (рис. 3b), из которых 5 фракций имеющие в качестве агликона – хедерагенин (сине-фиолетовые хроматографические зоны; В, D, E, F и H) и 3 фракции олеаноловой кислоты (хроматографические зоны розового цвета; А, С и G). По ТСХ фракции гликозидов идентифицированы с заведомыми образцами гликозидов. Установлено, что фракции А и В представляют собой 3-О- α -L-арабинопиранозиды олеаноловой кислоты (1) и хедерагенина (2), соответственно. Фракции С и D – 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозиды олеаноловой кислоты (3) и хедерагенина (4), соответственно. Фракция E представляет собой 28-О- β -D-глюкопиранозидовый эфир 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина (5). Фракция F – 28-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-О- β -D-глюкопиранозидовый эфир 3-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина (6). Фракции G и H представлены 28-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-О- β -D-глюкопиранозидовыми эфирами 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозидов олеаноловой кислоты (7) и хедерагенина (8), соответственно. Данные гликозиды ранее были выделены из различных видов растений семейства Аралиевых.

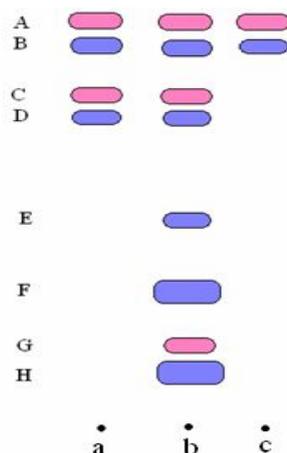
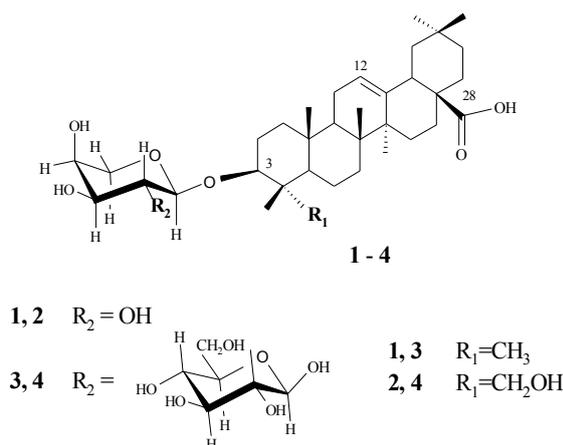


Рис. 3. Схема распределения гликозидных фракций из листьев интактных растений и каллусных культур черешков растения *Fatshedera lizei*.

1а – гликозидные фракции из каллуса, полученного на модифицированной питательной среде МС6;

2b – гликозидные фракции из листьев интактных растений;

3с – фракции из каллуса, полученного на модифицированной питательной среде МС7.



При анализе каллусных культур на содержание тритерпеновых гликозидов (рис. 3 а, с) нами установлено, что они отличаются от интактных эксплантов по фракционному составу исследуемых веществ и при этом важное значение имеет среда культивирования, более того продуцируются преимущественно монодесмозидные гликозиды, содержащие углеводный компонент только по атому агликона С-3. Так, при анализе каллусных культур, культивируемых на среде МС6

нами были идентифицированы 4 фракции гликозидов (**A, B, C, D**), а на среде МС7 только 2 фракции гликозидов (**A, B**).

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред для индукции каллусогенеза из эксплантов вегетативных органов растения *Fatshedera lizei*. Химический анализ каллусных культур показал присутствие в них различных фракций тритерпеновых гликозидов. Изложенные результаты подтверждают уже известные факты о возможности получения клеточных культур растений, накапливающих тритерпеновые гликозиды. Так, в последние годы удалось получить экспериментальные доказательства о содержании тритерпеновых гликозидов в каллусных и суспензионных клеточных культурах *Ginkgo biloba* L., *Atroгене sibirica* L., *Ycca macrocarpa* Englem, *Dioscorea deltoidea* W., *Clematis vitalba* L., *Nerium oleander* L. При этом было показано, что биосинтез гликозидов зависит от типа экспланта, способности к гистогенезу, условий культивирования и состава питательной среды.

Поскольку исследований по получению каллусных культур *Fatshedera lizei* и анализу их на тритерпеновые гликозиды ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих спектр тритерпеновых гликозидов, аналогичных интактному растению.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза и получения каллусной культуры из эксплантов вегетативных органов *Fatshedera lizei*.
2. Показано, что первичные и пассируемые каллусные культуры отличаются высоким уровнем морфологической гетерогенностью.
3. Установлено, что каллусные культуры из эксплантов ювенильных листьев и листовых черешков *Fatshedera lizei* содержат тритерпеновые гликозиды, характерные для интактного растения.

Список литературы

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
2. 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.
3. Гришковець В. І. Тритерпенові глікозиди аралієвих: виділення, встановлення будови, біологічна активність та хемотаксономічне значення : автореф. дис... д-ра хім. наук : 02.00.10 / Гришковець Володимир Іванович; Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Багатського НАН України. – Одеса, 2004. – 39 с.
4. Кемоклидзе З. Тритерпеновые гликозиды фатсии японской – *Fatsia japonica*, культивируемой в Грузии и новый лекарственный препарат фатцифлогин : автореф. дис. ... канд. фармац. наук спец: 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакология / Зураб Кемоклидзе; АН Грузии, Ин-т фармаколог. – Тбилиси, 1999. – 26 с.
5. Смычков В. Ф. Противовоспалительные свойства сапонинов плюща колхидского / В.Ф. Смычков, Н.Ф. Фаращук // Здоровоохр. Белоруссии. – 1975. – Т. 2, № 11. – С. 27.
6. Murashige T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V.15. – P. 473–497.

7. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
8. Культура клеток растений : [Сб. ст.] / АН СССР, Ин-т физиологии им. К. А. Тимирязева, Отв. ред. Р.Г. Бутенко. – М. : Наука, 1981. – 168 с.

Чмелюва С.І. Калусні культури *Fatshedera lizei* - продуценти тритерпенових глікозидів / С.І. Чмелюва, Т.Ю. Брановицька, Д.О. Панов, О.В. Омельченко, І.О. Бугара // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 313-320.

Досліджено особливості індукції калусогенезу в культурі вегетативних органів *Fatshedera lizei*. Підбрано модифікації живильних середовищ Мурасіге і Скуга для калусогенезу. Перепасований калус відрізнявся високим рівнем морфологічної гетерогенності. Отримано експериментальні докази про присутність в калусних культурах різних фракцій тритерпенових глікозидів, аналогічних інтактній рослині.

Ключові слова: *Fatshedera lizei*, калусна культура, тритерпенові глікозиди.

Chmeleva S.I. Callus cultures *Fatshedera lizei* - producers of triterpene glycosides / S.I. Chmeleva T.Y. Branovitskaya, D.A. Panov, A.V. Omelchenko, I.A. Bugara // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 2. – P. 313-320.

The features of the induction of callus induction in the culture of the vegetative organs *Fatshedera lizei*. Podobranny modification of culture media Murashige and Skoog medium for callus induction. Passiruemu callus has a high level of morphological heterogeneity. Experimental evidence of the presence of callus cultures of different fractions of triterpene glycosides similar to intact plants.

Keywords: *Fatshedera lizei*, callus culture, triterpene glycosides.

Поступила в редакцію 26.05.2011 г.