

УДК 582.675.1.086.83.:547.91

## КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЛОМОНОСА ВИНОГРАДОЛИСТНОГО (*CLEMATIS VITALBA* L.) – ПРОДУЦЕНТЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Бугара А.М., Чмелева С.И., Сидякин А.И., Панов Д. А., Работягов В.Д.

Возможности и перспективы использования культивируемых клеток растений для получения биологически активных веществ уже давно привлекают исследователей в области биотехнологии. Это направление в последнее десятилетие разрабатывается достаточно интенсивно в связи с остротой экологических проблем и ограниченностью природного растительного лекарственного сырья. В этой связи использование культивируемых клеток растений видится сегодня как реальная возможность получения экологически чистых лекарственных препаратов и сохранения растительных ресурсов. Однако, несмотря на то, что на пути реализации этой возможности необходимо решение еще целого ряда теоретических и прикладных вопросов, первостепенное значение приобретают исследования, направленные на получение клеточных культур-продуцентов ранее не изученных в этом отношении перспективных видов растений.

Ломонос виноградолистный (*Clematis vitalba* L.) содержит гликозиды тритерпенового и стероидного ряда, обладающих широким спектром фармакологического действия. Среди тритерпеновых гликозидов преобладающими являются витальбозиды А, В, С, D, E, F, G, H, I, J [1, 2]. Исследований по получению клеточных культур ломоноса виноградолистного, содержащих тритерпеновые гликозиды, ранее не проводилось и данный вид как объект биотехнологии остается совершенно не изученным.

В этой связи целью настоящей работы являлось получение каллусных культур ломоноса виноградолистного и их анализ на содержание различных фракций тритерпеновых гликозидов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили вегетативные органы растений ломоноса виноградолистного, произрастающих в естественных фитоценозах. В качестве инициальных эксплантов использовали вегетативные апексы побега, ювенильные листья и сегменты зрелых листьев. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили 50% раствором препарата "Брадофен" (2 минуты), а затем 5% перекисью водорода (одна

минута) с последующей промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Экспланты помещали на поверхность агаризованных питательных сред Мурасиге-Скуга [9] и Гамборга-Эвелеге [3], дополненных ИУК (индолилуксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и БАП (6-бензиламинопурин). В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие 10 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 30 эксплантов определенного типа в трёхкратной повторности. Экспланты культивировали при освещенности 4-5 тыс. люкс, температуре 20-24°C и относительной влажности воздуха 60-70%. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных (в процентах). Полученный первичный каллус переносили на свежие питательные среды и в дальнейшем культивировали на свету или в темноте.

Для химического анализа на содержание тритерпеновых гликозидов каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, извлекали из культуральных пробирок и высушивали при комнатной температуре. Воздушно-сухую массу тщательно измельчали и экстрагировали 80 %-ным изопропиловым спиртом. Для определения тритерпеновых гликозидов использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках "Silufol" [4], в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (100:40:7). Детектирование фракций тритерпеновых гликозидов на хроматограммах осуществляли 10%-ным спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с добавлением 2 % *para*-оксибензальдегида с последующим нагреванием хроматограмм при 100-120°C. В качестве контроля использовали водно-спиртовые растворы экстрактов из листьев и корней ломоноса виноградолистного.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре тканей ломоноса виноградолистного показали, что этот процесс в значительной степени зависел от типа экспланта и состава питательной среды (табл.). Лучшая способность к каллусогенезу обнаруживалась при культивировании эксплантов на модифицированной питательной среде Гамборга-Эвелеге. В данном случае частота каллусообразования составляла от 39,7 до 89,6%. При этом лучшей способностью к каллусогенезу отличались экспланты вегетативных апексов побега. В процессе культивирования эксплантов на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга частота каллусообразования составляла 30,3- 44,6% и максимальное значение данного показателя наблюдалось также для эксплантов вегетативных апексов.

При введении эксплантов в условия *in vitro* первые признаки каллусогенеза обнаруживались, как правило, через 1-2 недели культивирования на модифицированной среде Гамборга-Эвелеге, и через 2-3 недели культивирования на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга. Образующийся каллус имел светло-зеленую окраску, характеризовался плотной консистенцией и невысокой интенсивностью роста. Однако на питательной среде Мурасиге-Скуга каллус характеризовался более низкой интенсивностью роста, чем на среде Гамборга-Эвелеге.

Визуальный анализ каллусных культур позволил выявить признаки морфогенеза, что проявлялось в индукции корнеобразования на 90 сутки культивирования.

Таблица.

Частота каллусообразования в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды

Модификация питательной среды	Типы и содержание фитогормонов в питательной среде, мг/л			Тип экспланта	Частота каллусообразования, %
	2,4-Д	ИУК	БАП		
Мурасиге – Скуга	2,5	1,0	0,4	вегетативный апекс	44,6 ± 1,5
				ювенильные листья	40,1 ± 0,9
				сегменты зрелой листовой пластинки	30,3 ± 0,9
Гамборга-Эвелега	2,5	1,0	0,4	вегетативный апекс	89,6 ± 2,4
				ювенильные листья	48,3 ± 1,3
				сегменты зрелой листовой пластинки	39,7 ± 1,0

Химический анализ корней и листьев интактного растения и каллусных культур ломоноса виноградолистного представлен на рисунке.

При анализе интактного материала ломоноса виноградолистного, было выявлено 10 различных фракций тритерпеновых гликозидов (Рис., а, б), из которых – 6 фракций хедерагенина (синие-фиолетовые хроматографические зоны) и 4 фракции олеаноловой кислоты (хроматографические зоны розового цвета). При этом в корнях обнаружено 6 фракций (Рис., а), из них 3 – хедерагенина (С, D, I) и 3 – олеаноловой кислоты (В, Е, G), а в листьях – 3 фракции хедерагенина (А, Н и J) и одна (F) – олеаноловой кислоты (Рис., б). По ТСХ фракции гликозидов А, С, Н и I были идентифицированы с известными образцами гликозидов хедерагенина. Установлено, что фракция А представляет собой 3-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид хедерагенина, фракция С – 3-О-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2) – О-α-L-арабинопиранозид хедерагенина, фракция Н – 28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-О-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозидовый эфир 3-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид хедерагенина и фракция I – 28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-О-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозидовый эфир 3-О-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозид хедерагенина. Данные гликозиды были ранее выделены из различных видов растений, например из *Hedera canariensis* [5, 6], *Acanthopanax sieboldianus* [7] и *Kalopanax septemlobum* [8].

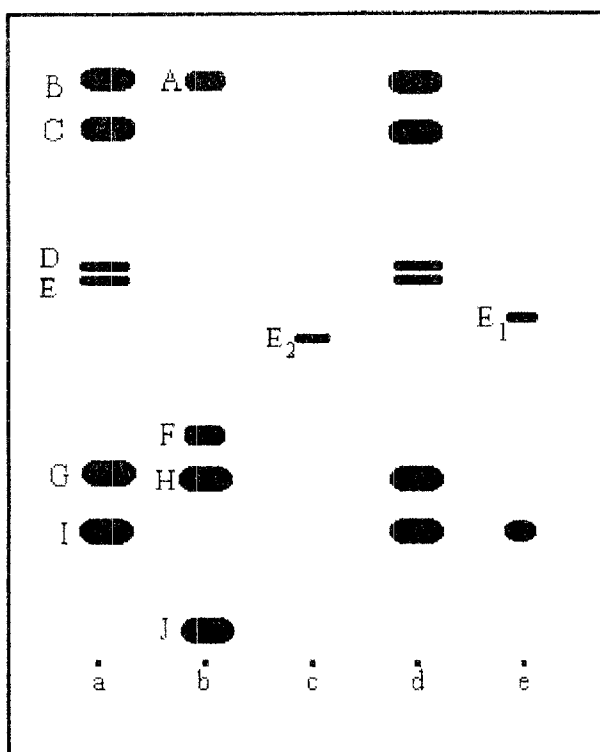


Рис. Схема распределения гликозидных фракций из органов интактных растений и каллусных культур ломоноса виноградолистного:

- a- гликозидные фракции из корней интактного растения;
  - b- гликозидные фракции из листьев интактного растения;
  - c- гликозидные фракции из каллуса, полученного на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга.
  - d- гликозидные фракции из неморфогенного каллуса, полученного на модифицированной питательной среде Гамборга-Эвелега;
  - e- гликозидные фракции из морфогенного каллуса, полученного на модифицированной питательной среде Гамборга-Эвелега;
- A, C, D, H, I, J, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> – гликозиды хедерагенина;  
 B, E, F, G – гликозиды олеаноловой кислоты.

При анализе каллусных культур на содержание тритерпеновых гликозидов (Рис., c, d, e) нами установлено, что они отличаются от интактных эксплантов по фракционному составу исследуемых веществ и при этом важное значение имеет среда культивирования. Так, при анализе первичных неризогенных каллусных культур, полученных из листовых эксплантов и культивируемых на среде Гамборга-Эвелега нами были идентифицированы все 6 фракций гликозидов, идентичных гликозидам корней интактного растения (Рис., d). При анализе морфогенных каллусных культур с признаками ризогенеза (Рис., e), кроме гликозида I, описанного выше, выявлен ранее не обнаруженный в корнях и листьях интактных растений, гликозид хедерагенина.

названный нами  $E_1$ . Аналогично, гликозид хедерагенина  $E_2$  был обнаружен в каллусных культурах, индуцированных из листовых сегментов на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга (Рис., с).

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред для индукции каллусогенеза из эксплантов вегетативных органов ломоноса виноградолистного. 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 культурах *Ginkgo biloba* L., *Atroгене sibirica* L., диоскореи дельтовидной, *Yucca macrocarpa* Englem. При этом было показано, что биосинтез гликозидов зависит от типа экспланта, способности к гистогенезу и морфогенезу, возраста каллусной культуры, условий культивирования и состава питательной среды [9, 10]

Поскольку исследований по получению каллусных культур ломоноса виноградолистного и анализу их на тритерпеновые гликозиды ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих широкий спектр тритерпеновых гликозидов. Особый интерес представляет выявление в каллусных культурах фракций гликозидов, не характерных для органов интактного растения. Эти результаты открывают возможности для дальнейших исследований, направленных на селективный отбор и получение каллусных и суспензионных культур, обладающих повышенной продуктивностью отдельных фракций тритерпеновых гликозидов, обладающих биологической активностью.

## ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза и получения каллусной культуры из эксплантов вегетативных органов ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.).

2. Установлено, что каллусные культуры из эксплантов вегетативного апекса, молодых и зрелых листьев содержат широкий спектр тритерпеновых гликозидов, характерных для интактного растения.

3. Показано, что морфогенные и неморфогенные каллусные культуры индуцированные из листьев, содержат фракции гликозидов ( $E_1$  и  $E_2$ ), не характерные для листьев и корней интактных растений.

## Список литературы

1. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения их химический состав и использование. – Л.: Наука, 1987. – Т 2. – С. 47.
2. Мельников В. Н. Химическое исследование гликозидов ломоноса виноградолистного // Автореферат дисс. канд. хим. наук. – Черновцы, 1974. – 18 с.
3. Урманцева В. В. Культивирование каллусных тканей на твердых питательных средах // Методы культивирования клеток. – Л.: Наука, 1987. – С. 221-231.

#### КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЛОМОНОСА ВИНОГРАДОЛИСТНОГО

4. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. – М.: Мир, 1980. – 621 с.
5. Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение таурозидов L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub> и L-I<sub>1</sub> из листьев *Hedera canariensis* // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377-383.
6. Гришковец В.И., Сидоров Д.Ю., Яковлевич Л.А., Арнаутов Н.Н., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Строение таурозидов L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub> и L-I<sub>1</sub> из листьев *Hedera canariensis* // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377-383.
7. Sawada H., Miyakoshi M., Isoda S., Ida Y., Shoji J. Saponins from leaves of *Acanthopanax sieboldianum* // Phytochemistry. – 1993. – V. 34, № 4. – P. 1117-1121.
8. Гришковец В.И., Патнов Д.А., Качала В.В., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum*. I. Гликозиды А, В, С, F, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, H, и J из листьев *Kalopanax septemlobum* var. *maximowichii*, интродуцированного в Крыму // Химия природ. соедин. – 2005. – № 2. – С. 156-159.
9. Носов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединения в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С.5-20.
10. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біхімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.

Поступила в редакцию 20.01.2006 г.