

УДК 581.1:575.2

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ЦИКЛАМЕНА – ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Юркова И.Н., Бугара А.М.*

Значительную часть лекарственных средств в настоящее время производят из природного растительного сырья, получаемого, как правило, из редких и исчезающих видов диких и плантационных растений. В связи с увеличением дефицита такого сырья и возрастающим антропогенным воздействием на окружающую среду наиболее перспективными являются биотехнологические методы получения фитомассы [1]. По сравнению с интактными растениями культуры тканей и клеток имеют ряд преимуществ: возможность получения экологически чистой биомассы, свободной от поллютантов, решение проблемы дефицита растительного сырья, синтез новых веществ, не содержащихся в целом растении, управление процессом биосинтеза, удешевление производства [2]. Однако из-за отсутствия разработанных биотехнологий известны лишь отдельные примеры производства фармпрепаратов из биологически активных веществ, полученных в культуре клеток растений [3].

В настоящее время все больший интерес привлекают различные виды цикламена, содержащего ценные фармакологически активные вещества группы тритерпеновых гликозидов (цикламин, мирабиллин, цикламинорин [4]). Первые упоминания о лечебных свойствах цикламена встречаются в литературных источниках еще в IV-III в.в. до н.э. Это является одной из причин ежегодного массового уничтожения редкого и исчезающего вида крымской флоры цикламена Кузнецова. Из сока клубней цикламена европейского производится лекарственный препарат “Синуфорте”, применяемый в отоларингологии при лечении воспалительных заболеваний околоносовых пазух. Клубни цикламена, используемые в качестве исходного сырья, выращиваются на плантациях Батумского ботанического сада в экологически чистых высокогорных районах Аджарии при постоянном контроле условий произрастания. Дефицит такого сырья является причиной высокой стоимости препарата “Синуфорте”. Получение биологически активных веществ из персидского цикламена, являющегося декоративной культурой, не представляется возможным из-за низкой скорости размножения. В связи с этим представляет интерес исследование возможности получения гликозидов в культуре клеток цикламена.

Цель данной работы заключалась в определении оптимальных условий получения каллусной культуры цикламена и анализе содержания в них биологически активных веществ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения эксперимента служили ткани и органы *Cyclamen kuznetzovii* Kotov et Czernova и *Cyclamen persicum* Mill. В качестве эксплантов использовали сегменты клубней, молодых листьев и черешков.

Перед посадкой материал поверхностно стерилизовали в течение 1 минуты 70%-ным этиловым спиртом и 10 минут 50%-ным брадофеном, затем экспланты промывали автоклавированной дистиллированной водой. Для индукции каллусогенеза экспланты в стерильных условиях ламинарного бокса помещали на поверхность различных вариантов агаризованной среды Мурасиге и Скуга [5], дополненной 2,4-Д и 6-БАП.

В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие по 20 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов определенного типа в трехкратной повторности. Культивирование проводили в темноте в условиях термостатируемого помещения при температуре 20-22° С и относительной влажности воздуха 60-70%.

Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Полученный первичный каллус переносили на свежие питательные среды и в дальнейшем культивировали в тех же условиях. Пассирование каллуса осуществляли каждые 30 дней. Для субкультивирования использовали питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 1,0-5,0 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) и 0,1-1,0 мг/л БАП (6-бензиламинопурин). Культивирование проводили в течение 30-35 суток. Прирост биомассы определяли визуально (в % от объема исходной биомассы) в конце цикла выращивания.

Для исследования содержания биологически активных веществ в биомассе каллусных культур (пятый пассаж) применяли биокондуктометрический экспресс-метод тестирования интегральной биологической активности, основанный на определении изменений проницаемости цитоплазматической мембраны тест-объекта [6].

При тестировании биологической активности тест-объектом служила альгологически чистая культура *Spirulina platensis* Geitl. в конце экспоненциальной фазы роста. Суспензию клеток тест-объекта отделяли от культуральной среды, экспонировали в водных экстрактах, содержащих БАВ, а затем ресуспендировали в слабо проводящей дисперсионной среде заданного состава, электропроводность  $K_0$  которой предварительно фиксировали. Величину кондуктометрического теста определяли по относительному  $\Delta K = (K_1 - K_0) / K_0$  изменению электропроводности среды и выражали в % по отношению к контролю (без БАВ), принимаемому за 100%. Экспресс-тестированию подвергали водные экстракты интактных растений и каллусных культур *C. persicum* третьего пассажа. Концентрацию БАВ определяли по количеству растительного материала, использованного для экстракции, в г сухого вещества на 1 дм<sup>3</sup>.

Химический анализ содержания тритерпеновых гликозидов каллусных культур (пятый пассаж) и интактных клубней *Cyclamen persicum* проводили методом тонкослойной хроматографии. Биомассу высушивали при комнатной температуре и измельчали в ступке с изопропанолом. На хроматографические пластины "Sorbfil"

наносили по 0,2 мл смеси, для разделения гликозидов на фракции использовали систему растворителей хлороформ : метанол : 25% аммиак (100:40:5). Пластины высушивали, проявляли в растворе фосфорновольфрамовой кислоты в 100% этаноле, а затем высушивали при 100-105 °С.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении в изолированную культуру эксплантов, взятых из различных органов *S. kuznetzovi* и *S. persicum*, у эксплантов *S. kuznetzovi* через 7-10 дней появлялось заражение мицелиарными грибами. Добавление в питательную среду различных антифунгальных препаратов вызывало лишь задержку проявления инфекции на 10-12 дней. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали *S. persicum*.

Показано, что для *S. persicum* оптимальными являются экспланты, полученные из верхней части черешков и оснований листьев на ранних стадиях вегетации, когда можно избежать обильного выделения фенолов. Оптимальной для каллусообразования была питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,4-Д (5 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). При этом индукция первичного каллуса наблюдалась через 7-10 суток.

При пассировании каллусные культуры не только сохраняли высокую скорость роста, но с увеличением количества пассажей скорость роста увеличивалась.

Хотя результаты были близки, наиболее интенсивный рост каллусов *S. persicum* обнаружен на средах с концентрациями 4,0-5,0 мг/л 2,4-Д+0,3-0,4 мг/л БАП. Менее интенсивный рост был отмечен на средах с концентрациями 1,0-3,0 мг/л 2,4-Д +0,5-2,0 мг/л 6-БАП. Прирост биомассы в первые двое суток не наблюдался (лаг-фаза), на 3-4 сутки культуры вступали в фазу экспоненциального роста, а на 30-е сутки – в стационарную фазу.

Были получены два штамма, различающиеся как морфологически, так и по скорости роста. Штамм А, полученный из сегментов листьев, серовато-белый, гранулированный, имел хорошо разветвленную поверхность, штамм Б, полученный из сегментов черешков, – более темный и плотный с округлыми контурами. Скорость роста штамма А была значительно выше, чем штамма Б. Ростовый индекс штамма А уже в первом пассаже составлял 5-6 при цикле выращивания 15-20 суток.

Получение новых высокопродуктивных штаммов с максимальным биосинтезом целевого продукта – длительный процесс, а определение низких концентраций БАВ в медленно растущих культурах традиционными химическими методами связано с определенными трудностями, главное из которых – накопление достаточно большого количества биомассы. Известные литературные данные в большинстве случаев свидетельствуют о невысоком уровне синтеза вторичных метаболитов в недифференцированных культурах клеток растений многих видов [7].

В работе [8] было показано, что для скрининга каллусных культур по биологической активности интактных тканей и культуры клеток лекарственных растений может быть успешно применен биокондуктометрический экспресс-метод тестирования БАВ.

Результаты биотестирования интегральной биологической активности экстрактов, полученных из клубней интактных растений *Cyclamen persicum* и

биомассы каллусных культур двух штаммов, биоимпедансным методом приведены на рис. 1.

Как видно из приведенных данных, у экстрактов каллусных культур биологическая активность ниже на 17-24% (рис. 1, кривые 2 и 3), чем у экстрактов клубней интактных растений (рис. 1, кривая 1). Однако ход кривой 2 позволяет предполагать, что при более высокой концентрации биомассы каллусной культуры штамма А в экстракте эффект может быть значительно выше.

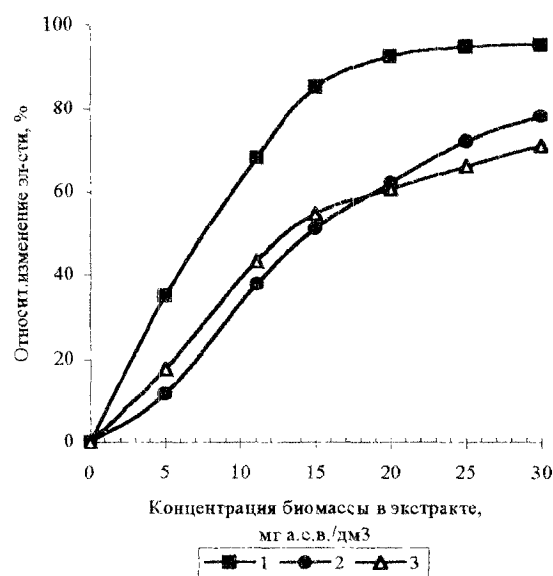


Рис. 1. Влияние концентрации биомассы в экстрактах клубней (1) и каллусных культур (штамм А – 2 и штамм Б – 3) цикламена персидского на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды, % после экспозиции тест-объекта. Время контакта биомассы тест-объекта с экстрактами – 10 минут.

Исходя из данных анализа тонкослойной хроматографии (рис. 2), можно заключить, что качественный состав гликозидов каллусных культур штаммов А и Б отличается. В каллусной культуре штамма А выявлено 4 фракции гликозидов, штамма Б – 5 фракций. Количество фракций гликозидов интактных клубней и каллусной культуры штамма Б, а также их расположение на хроматограмме наиболее близки, в отличие от штамма А.

## ВЫВОДЫ

1. Получены активно растущие каллусные культуры *Cyclamen persicum*.
2. Состав гликозидов в полученных каллусных культурах и клубнях интактных растений близок. Это подтверждается результатами биотестирования интегральной биологической активности экстрактов клубней и каллусных культур.

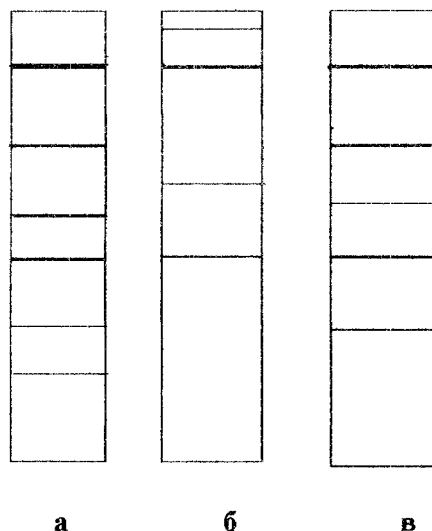


Рис. 2. Тонкослойно-хроматографический анализ гликозидов intactных клубней и каллусных культур *Cyclamen persicum*: а) intactные клубни; б) каллусная культура штамм А; в) каллусная культура штамм Б.

3. Проведенные исследования показывают, что каллусные культуры *Cyclamen persicum* могут быть перспективным альтернативным источником фармакологически активных тритерпеновых гликозидов.

#### Список литературы

1. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
2. Левенко В.А. Биотехнология растений: сегодня и завтра // Физиология и биохимия культур. раст. – 1999. – Т.32. №3. – С. 163-171.
3. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 285 с.
4. Galis T., Satana M.E., Yuruker A. Triterpene saponins from *Cyclamtn mirabile* and their biological activities // J. Nat.Prod. – 1997. – V.60, №3. – P. 315-318.
5. Основы сельскохозяйственной биотехнологии/ Г.С.Муромцев, Р.Г.Бутенко и др. – Агропромиздат, 1990. – 384 с.
6. Пат. 2002108456 Украины, МКИ<sup>5</sup> С 12 М 1/36, С 12 М 1/38, С 12 Q 3/00. Способ контроля изменений активности микроорганизмов/ И.Н.Юркова, В.Р.Эстрела-Льовис, Т.И.Бородинова. – Опубл. 16.06.2003. Бюл. № 6.
7. Бутенко Р.Г. Перспективы использования культивируемых клеток растений в биотехнологии/ Биотехнология. М.: Наука, 1984. – С. 139-147.
8. Юркова И.Н. Экспресс-тестирование биологической активности каллусных культур лекарственных растений / Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана: Тематический сборник научных трудов. – Симферополь : Таврия, 2004. – Вып. 14. – С. 108-112.

Поступила в редакцию 20.02.2006 г.