

## ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ *POTENTILLA ALBA* L. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

М.В. Китаева, А.В. Зубарев, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников

ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

### Введение

Несмотря на развитие химической промышленности, растительные ресурсы остаются единственным источником получения ряда важных веществ: сердечных гликозидов, флавоноидов, кумаринов, эфирных масел и др. Между тем, возможности получения так называемых «метаболитов интереса» в достаточном количестве зачастую ограничены. Это связано с сокращением ресурсов некоторых ценных дикорастущих растений, принадлежностью многих лекарственных растений к группам эндемиков, редким и исчезающим видам. В связи с этим большой интерес в качестве источника биологически активных веществ представляют культуры растительных клеток и тканей [1].

В настоящее время практический интерес представляют культивируемые и дикорастущие лекарственные растения, принадлежащие к роду Лапчатка (*Potentilla* L.), так как содержат ряд важных групп соединений вторичного происхождения, используемых в разных отраслях народного хозяйства (фармацевтическая, пищевая, сельскохозяйственная). Виды рода *Potentilla* L. применяются с давних времен в народной медицине за свои целебные свойства.

Лапчатка белая (*Potentilla alba* L.) является представителем одного из крупнейших по числу видов рода растений семейства Rosaceae. Многолетнее травянистое лекарственное растение, 8–25 см высоты, с толстым маловетвистым длинным (до 50 см и более) черно-бурым корневищем. *P. alba* L. вошла в официальную медицину более 30 лет назад. Известно, что лекарственные средства *P. alba* L. оказывают влияние на щитовидную железу, регулируют ее функцию, ликвидируют диффузные изменения, снимают многочисленные токсические явления в организме [2]. Полезные свойства *P. alba* L. определяются ее уникальным химическим составом, относительно изученным в настоящее время. Корневище с корнями *P. alba* L. содержат углеводы (крахмал), иридоиды, сапонины, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды (кверцетин), дубильных веществ (галлотанин) до 17%. В траве *P. alba* L. обнаружены иридоиды, сапонины, фенолкарбоновые кислоты и их производные, флавоноиды (рутин), дубильные вещества. Установлено, что лапчатка является концентратором Mn, Zn, Cu, Se, а также содержит большие количества Co, Ni, Ba. *P. alba* L. отличается высоким содержанием дубильных веществ [3]. На территории Республики Беларусь лапчатка белая встречается в южной и центральной части нашей страны, иногда в северных районах республики, однако этот вид становится все более редким вследствие интенсификации сельского и лесного хозяйства. В Республике Беларусь *P. alba* L. занесена в «Красную книгу Республики Беларусь» как таксон, подверженный риску вымирания (III категория охраны (VU)).

Большинству таксонов *Potentilla* L. характерно высокое содержание флавоноидов и в частности флавонолов. Основными фармакологическими свойствами флавонолов являются антиоксидантное, противовоспалительное, ангиопротекторное действие [4]. Также известно, что *P. alba* L. содержит дубильные вещества смешанной группы. Лекарственное сырье и препараты, содержащие дубильные вещества, применяют в медицине в качестве вяжущих, кровоостанавливающих, противовоспалительных, антимикробных средств. Для конденсированных дубильных веществ отмечена высокая Р-витаминная, антигипоксическая, противосклеротическая активность; производные катехинов проявляют противоопухолевое действие [5].

В связи со всем этим идет активный поиск новых альтернативных и экономически доступных источников получения биологически активных веществ растительного происхождения, одним из которых являются культуры клеток и тканей растений. Метод выращивания изолированных тканей растений обладает рядом преимуществ, таких как возможность выделения необходимых веществ независимо от изменчивых факторов внешней среды, гарантированное отсутствие в биомассе поллютантов, использование малых площадей для выращивания культуры и возможность регуляции синтеза вторичных метаболитов путем изменения условий культивирования, и может составить альтернативу классическим приемам культивирования лекарственного растительного сырья. Данный метод также позволяет более рационально использовать растительный ресурс лапчаток из-за ограниченного распространения данного вида на территории Республики Беларусь.

Целью нашей работы являлось исследование содержания веществ фенольной природы в каллусной ткани и интактном растении лапчатки белой. Изучение метаболических процессов в культуре *in vitro* необходимо для получения высокопродуктивных клонов с повышенным синтезом экономически важных биологически активных веществ.

### Методы исследования

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили сегменты черешков листьев интактного растения *P. alba* L.

Стерилизующими агентами выступали хлоргексидина биглюконат (0,05%) и прозаро (0,1%). Черешки последовательно экспонировали в течение 10 минут в растворах обоих агентов. Отмытые в стерильной дистиллированной воде экспланты разделяли на сегменты по 8–10 мм длиной, исключив оба концевые.

Для инициации каллусогенеза у сегментов черешков листьев интактного растения и корешков из стерильной культуры испытывали питательные среды на основе минерального состава среды Мурасиге и Скуга, дающей хорошие результаты при каллусообразовании и культивировании клеточных культур большинства двудольных растений [6], в сочетании с цитокинином 6-бензиламинопурином (6-БАП) и ауксином 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д). Экспланты культивировали в чашках Петри в термостате без освещения при температуре 22–24°C. Контаминация вводимого в культуру материала через 10 дней культивирования составила  $7,5 \pm 0,5\%$ .

Для количественного определения суммы фенольных соединений применяли метод, основанный на окислении реагентов Folin-Ciocalteu, содержащих фосфомолибдат натрия и вольфрамат натрия [7]. Сумму фенольных соединений определяли в первичных каллусах листового и корневого происхождения со сроком культивирования 45 дней (рисунок 1) и в органах интактных растений *P. alba* L. коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси произрастающих в полевых условиях. Растения исследовали в фазу массового цветения (2011 год). Для построения калибровочного графика была использована галловая кислота. Интенсивность полученного голубого комплекса оценивали через 30–40 минут после начала реакции на спектрофотометре «Agilent 8453» (Agilent Technologies, США) при длине волны 725 нм в кювете толщиной 1 см.

Анализ флавоноидов *P. alba* L. проводили в спиртовых экстрактах в пересчете на рутин по методике количественного определения флавоноидов, основанной на спектрофотометрии комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия [8]. Спектры снимали на регистрирующем спектрофотометре «Agilent 8453» (Agilent Technologies, США). Оптическую плотность испытуемого раствора и раствора сравнения измеряли при 412 нм.

Для определения дубильных веществ в лекарственном сырье использовали методику, изложенную в Государственной фармакопее Республики Беларусь, том 2 в пересчете на танин [9]. Содержание дубильных веществ определяли после реакции полученного экстракта с раствором индигосульфокислоты и дальнейшим титрованием ее 0,02 М раствором калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания.

Все исследования проводились в трехкратной повторности с последующей статистической обработкой полученных данных с использованием MS Excel 2010 (данные считали достоверными при  $P < 0,05$ ).



А – сегмент листового черешка; Б – сегмент корня

Рисунок 1 – Каллусогенез на эксплантах *P. alba* L. различного происхождения

### Результаты и обсуждение

Известно, что важным и необходимым условием дедифференцировки растительной клетки и индукции каллусогенеза является присутствие в питательной среде ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают пролиферацию дедифференцированных клеток. Регуляторы роста оказывают влияние не только на рост и дифференциацию в культурах клеток и тканей, но и на вторичный метаболизм [8].

Нами был произведен подбор оптимальных условий для инициации в тканях эксплантов лапчатки белой каллусогенеза. Для этого использовали сегменты листовых черешков. Фитогормоны были испытаны в определенных диапазонах концентраций: 6-БАП – от 0 до 1,0 мг/л; 2,4-Д – от 0 до 0,5 мг/л.

Полученные данные отражены на рисунке 2 и свидетельствуют о том, что присутствие фитогормонов в большинстве вариантов вызывало образование раневой меристемы.

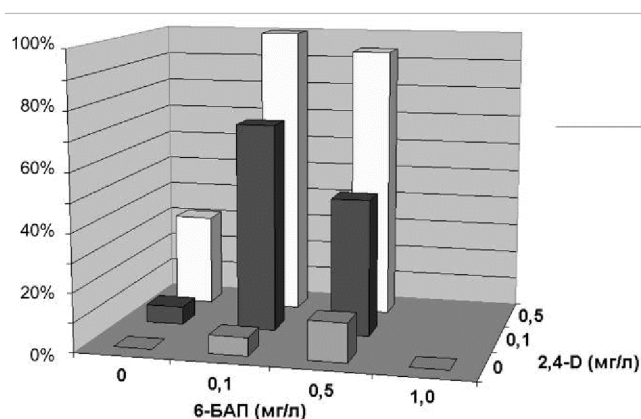


Рисунок 2 – Влияние различных концентраций 6-БАП и 2,4-Д на образование первичного каллуса у эксплантов *Potentilla alba* L.

2,4-Д при этом в большей степени стимулировал развитие каллуса, чем 6-БАП. Высокую каллусогенную активность эксплантов наблюдали на питательных средах, содержащих 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 и 0,5 мг/л 6-БАП на эксплантах в обоих случаях. Ниже степень каллусогенеза наблюдалась в вариантах сред 0,1 мг/л 2,4-Д в сочетании с 0,1 и 0,5 мг/л 6-БАП. В вариантах без 2,4-Д и в варианте с 0,1 мг/л 2,4-Д без 6-БАП преобладали некротические процессы, и наблюдалась гибель эксплантов.

В результате было решено использовать для инициации каллусогенеза в дальнейших экспериментах питательную среду с концентрациями: 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л 6-БАП. В

течение всего периода культивирования оценивали морфологическое состояние полученных каллусов посредством визуального наблюдения. Окраска каллусов обоих типов происхождения заметно не отличалась и была светлого кремового цвета. По мере культивирования (к концу 3-ей декады) развивался буроватый оттенок, который был заметнее в случае листового каллуса, что предположительно было обусловлено повышением содержания в клетках каллуса вторичных метаболитов фенольной природы.

Первичный каллус, как у сегментов черешков, так и корневых сегментов характеризовался относительно высокой плотностью, что согласовалось с показателями содержания сухих веществ в каллусах двух типов происхождения (16,7% и 16,9%, соответственно) [10].

Определение суммы фенольных соединений в каллусах *P. alba* L. в возрасте 45 дней показало, что наиболее высокое содержание их наблюдалось в каллусе корневого происхождения и составило  $14,8 \pm 0,05\%$ , что в 8 раз больше показателей, полученных при исследовании органов надземной и подземной частей интактных растений лапчатки в фазу массового цветения –  $1,75 \pm 0,04\%$  и  $1,88 \pm 0,06\%$ , соответственно. Результаты представлены на рисунке 3.

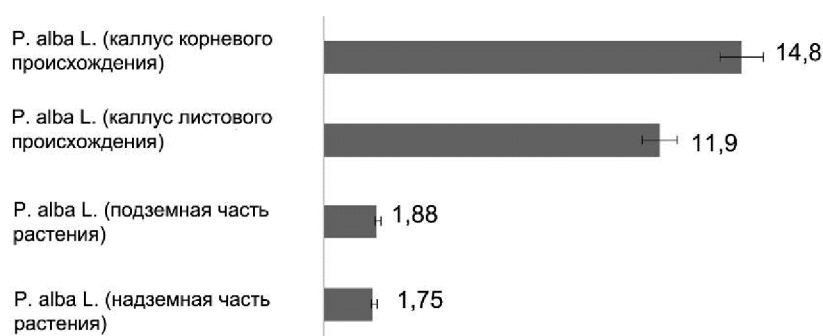


Рисунок 3 – Содержание суммы фенольных веществ (% на абсолютно сухое сырье) в надземных и подземных частях интактного растения и двух типах каллуса *P. alba* L.

Также было отмечено, что каллусная ткань корневого происхождения, как и корни интактного растения, содержат большее количество фенольных соединений, чем надземная фитомасса и каллус листового происхождения.

Содержание флавоноидов (в пересчете на рутин) в экстрактах первичного каллуса листового происхождения, как показано на рисунке 4, составило  $4,26 \pm 0,04\%$ , а дубильных веществ  $10,3 \pm 0,18\%$ . Полученные значения превышают максимальные показатели в листьях интактного растения в фазу массового цветения:  $2,33 \pm 0,03\%$  и  $5,30 \pm 0,06\%$ , соответственно.

Содержание флавоноидов в каллусе корневого происхождения носило следовой характер. Дубильных веществ оказалось в 1,7 раз меньше ( $9,8 \pm 0,09\%$ ), чем в интактном растении в фазу массового цветения ( $16,4 \pm 0,06\%$ ).

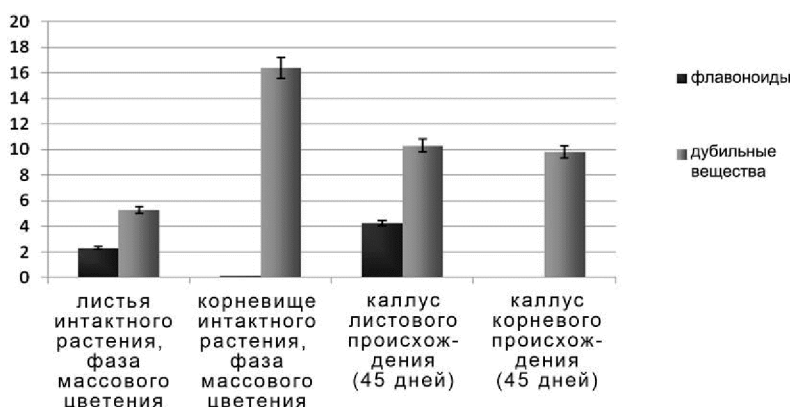


Рисунок 4 – Содержание флавоноидов и дубильных веществ (% на абсолютно сухое сырье) в надземных и подземных частях интактного растения и двух типах каллуса *P. alba* L.

**Выводы**

Полученные результаты свидетельствуют о высокой активности синтеза фенольных соединений в каллусной культуре ткани лапчатки белой. Каллусы различного происхождения обнаружили отличия в способности продуцировать некоторые группы вторичных метаболитов. Так содержание общей суммы фенольных соединений в каллусах превосходило в 6–8 раз это значение в интактном растении, что делает целесообразным изучение качественного состава соединений этого класса.

Таким образом, использование культуры клеток и тканей *Potentilla alba* L., является актуальным и перспективным наряду с полевым культивированием для получения сырья для фармакологической промышленности.

**Благодарности**

Выражаем благодарность зав. лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» к.б.н. Кухаревой Л.В. за предоставленный из полевой коллекции материал лапчатки белой.

**Список литературы**

1. Сидоров, В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В.А. Сидоров; Отв. ред. Глеба Ю.Ю. – Киев: Наук. Думка, 1990. – С. 280.
2. Шимко, О.М. Оценка травы лапчатки белой / О.М. Шимко, О.М. Хишова // Вестник фармации. – № 1, вып. 47. – 2010. – С. 17–24.
3. Семенова, Е.Ф. Химический состав лапчатки белой и применение ее с лечебной целью / Е.Ф. Семенова, Е.В. Преснякова // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2001. – № 5. – С. 32–34.
4. Andersen, Q.M. Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications / Q.M. Andersen, K.R. Markham // Taylor and Francis Group. – 2006. – P. 617–917.
5. Яковлева, К.Ф. Растения для нас / К.Ф. Яковлева, Г.П. Блинова // Справочное пособие: Учебная книга / К.Ф. Яковлева, Г.П. Блинова. – С.Пб., 1996. – С. 474–476.
6. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ. – 2010. – Т. 4, ч. 2. – С. 1–15.
7. Wrolstad, R.E. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin – Ciocalteu Reagent / R.E. Wrolstad, R.M. Wiley Orthofer Lamuela-Raventos // Methods in Enzymology. – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.
8. Шимко, О.М. Количественное определение флавоноидов в траве лапчатки белой / О.М. Шимко, О.М. Хишова // Вестник фармации. – 2010. – № 1. – С. 17–24.
9. Шеряков, А.А. Контроль качества вспомогательных веществ лекарственного растительного сырья / А.А. Шеряков // Государственная фармакопея Республики Беларусь в трех томах / А.А. Шеряков. – Молодечно: Типография Победа, 2008. – Т. 2. – С. 366–367.
10. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков и [др.]; под ред. А.И. Ермакова. 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – С. 25–26.

**PHENOLIC SECONDARY METABOLITES IN *POTENTILLA ALBA* L.  
IN *IN VITRO* CONDITIONS**

**M.V. Kitaeva, A.V. Zubarev, E.V. Spiridovich, V.N. Reshetnikov**  
*The Central Botanical Garden of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

Content of phenolic secondary metabolites in cell culture variety of origins and in native plant *Potentilla alba* L. what was grown in the Central Botanical Garden of the NAS of Belarus is examined and relative analysis of the achieved data is conducted. Using tissue culture methods allow to get increasing the content of biological activities substances from *Potentilla alba* L. is appropriate and require further research.