

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* РУТЫ ДУШИСТОЙ (*RUTA GRAVEOLENS* L.) – ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н.С. Бурая, Т.И. Фоменко

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Введение

Растения являются продуцентами многих биологически активных веществ (БАВ), способных оказывать влияние на биологические процессы в организме человека. БАВ чаще всего принадлежат к продуктам вторичного обмена – основным классам вторичных метаболитов – алкалоидам, изопреноидам, фенольным соединениям. Многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений, часто принадлежащих к редким видам, что негативно сказывается на биоразнообразии. В настоящее время идет активный поиск новых альтернативных источников получения биологически активных веществ растительного происхождения, одним из которых являются культуры клеток и тканей растений. Метод культуры клеток имеет ряд преимуществ, среди которых радикальное решение проблемы дефицита исходного сырья, возможность получения фитомассы, полностью свободной от поллютантов (гербицидов, пестицидов, радиоактивных веществ), управление процессом биосинтеза целевых продуктов, поиск индукторов усиления синтеза БАВ. При культивировании клеток *in vitro* возможно создание условий, позволяющих выделить отдельные новые штаммы клеток с устойчивой направленностью метаболизма на синтез веществ вторичного происхождения [1, 2, 3]. Рута душистая является ценным лекарственным растением, которое используется для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, обладает противовоспалительными, спазмолитическими и общеукрепляющими свойствами. Лекарственные свойства руты обеспечиваются содержанием в надземных частях растения эфирного масла (0,25–1,2%), флавоноидного гликозида рутина, фурукумарина бергаптена, алкалоидов (рутакридона), органических кислот, витаминов и других БАВ [4–7]. Целью данной работы явилось исследование особенностей роста и развития клеточных культур руты душистой и растений в условиях *in vitro*, а также анализ их биосинтетической активности. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: ввести растения *Ruta graveolens* L. в культуру *in vitro*, подобрать оптимальный фитогормональный состав среды культивирования для инициации каллусогенеза и поддержания роста каллусных культур, проанализировать биосинтетический потенциал растений в условиях *in vitro* и каллусной ткани руты душистой.

Методы исследования

В качестве объекта исследования использовалось лекарственное растение Рута душистая (*Ruta graveolens* L.). Введение руты душистой в культуру *in vitro* осуществляли путем выдерживания семян в течение 20 и 30 мин в следующих стерилизующих реагентах: 0,1% нитрат серебра; 0,1% диацид; 7% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Затем производили оценку влияния стерилизации на стерильность семян и их жизнеспособность по критерию всхожести.

Для индукции каллусогенеза у асептических листовых и стеблевых эксплантов руты душистой использовалось 19 вариантов питательных сред на основе среды Мурасиге-Скуга (МС), которые различались соотношением 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и 6-бензиламинопурина (БАП) (таблица 1). Исследованные среды были условно разделены на 4 группы:

1. Среды с различной концентрацией 2,4-Д (1–5);
2. Среды с различной концентрацией 2,4-Д и низкой (0,1 мг/л) концентрацией БАП (6–10);
3. Среды с равной концентрацией 2,4-Д и БАП (11–16);

4. Среда с соотношением концентраций 2,4-Д:БАП, равным 2:1 и 2:1,5 (17–19).

Таблица 1 – Варианты сред, используемых для индукции каллусогенеза у листовых и стеблевых эксплантов *Ruta graveolens* L.

Среда	Сочетание фитогормонов
1	0,1 мг/л 2,4-Д
2	0,5 мг/л 2,4-Д
3	1 мг/л 2,4-Д
4	1,5 мг/л 2,4-Д
5	2 мг/л 2,4-Д
6	0,1 мг/л БАП+0,2 мг/л 2,4-Д
7	0,1 мг/л БАП+0,5 мг/л 2,4-Д
8	0,1 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д
9	0,1 мг/л БАП+1,5 мг/л 2,4-Д
10	0,1 мг/л БАП+2 мг/л 2,4-Д
11	0,1 мг/л БАП+0,1 мг/л 2,4-Д
12	0,3 мг/л БАП+0,3 мг/л 2,4-Д
13	0,5 мг/л БАП+0,5 мг/л 2,4-Д
14	1 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д
15	1,5 мг/л БАП+1,5 мг/л 2,4-Д
16	2 мг/л БАП+2 мг/л 2,4-Д
17	0,5 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д
18	1 мг/л БАП+2 мг/л 2,4-Д
19	1 мг/л БАП+1,5 мг/л 2,4-Д

Для изучения влияния фитогормонов на ростовые процессы каллусной ткани использовался такой ростовой параметр как индекс роста ($I = (W_t - W_0) / W_0$), где W_0 – начальная масса каллуса, г; W_t – масса каллуса в конце цикла выращивания, г. [8].

Биосинтетическую активность каллусных тканей и растений руты душистой, выращенных в условиях *in vitro* на первом этапе оценивали качественно при помощи цветных реакций: цианидиновой пробы, реакций с хлоридом железа и хлоридом алюминия [9].

Для количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах руты душистой использовали спектрофотометрический анализ комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия [10].

Результаты и обсуждение

Стерилизация эксплантов, а также семян проводится путем выдерживания их в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой стерильной водой. Время стерилизации зависит от характера экспланта и от стерилизующей активности раствора. Обычно семена стерилизуют 10–20 минут, а вегетативные части 5–10 минут [11]. Для получения стерильной культуры *in vitro* руты душистой использовали семена из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Стерилизацию семян проводили со стерилизующими агентами: $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (7%), диацид (0,1%) и нитрат серебра (0,1%). Оценивалось влияние данных соединений на стерильность семян и их жизнеспособность по критерию всхожести. Время экспозиции в стерилизующих растворах составляло 20 и 30 минут.

Наибольший процент стерильных семян получен при использовании диацида и нитрата серебра при времени экспозиции 30 мин, между данными показателями нет достоверных отличий (рисунок 1). Снижение экспозиции воздействия данных реагентов приводило к уменьшению процента стерильных семян. При использовании в качестве стерилизующего агента 7% раствора $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ отмечен наиболее низкий выход стерильных семян (5 и 15%

при времени экспозиции 20 и 30 мин соответственно) по сравнению с другими использованными растворами.

Наибольший процент жизнеспособных семян (более 60%) получен при выдерживании в течение 20 минут в 0,1% растворе нитрата серебра. При увеличении времени экспозиции количество жизнеспособных семян снижается. Количество жизнеспособных семян при стерилизации в диациде меньше вдвое, чем при использовании нитрата серебра. А в случае применения для стерилизации раствора $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ жизнеспособных семян при времени экспозиции 30 мин вообще получено не было.

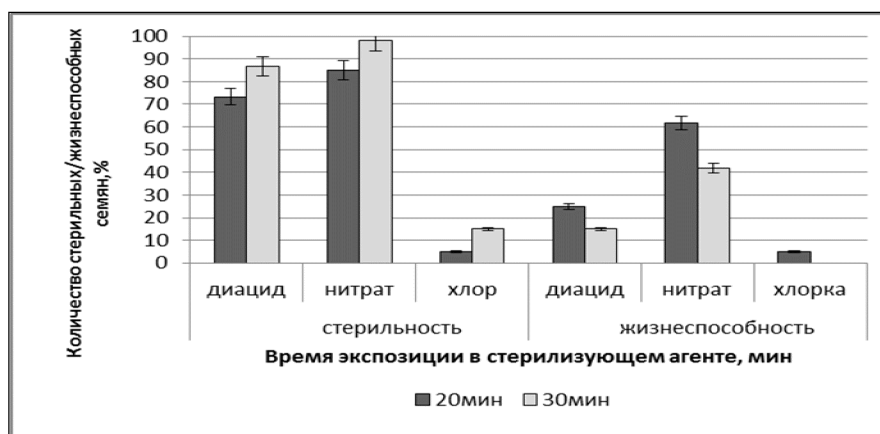


Рисунок 1 – Зависимость стерильности и жизнеспособности семян от стерилизующего агента и времени экспозиции в нем

Таким образом, с учетом стерильности и процентного содержания жизнеспособных семян руты душистой, следует, что наиболее подходящим способом стерилизации из рассмотренных выше является стерилизация с использованием нитрата серебра с 20 минутной экспозицией в растворе.

На следующем этапе работы стерильные семена руты душистой переносили в колбы с безгормональной питательной средой МС. Полученные стерильные на 30–35 сутки культивирования стерильные растения использовались для индукции каллусогенеза. Для получения каллусной ткани руты использовали листовые и стеблевые (междоузлия верхнего и нижнего яруса растения) экспланты, которые помещали на 19 вариантов сред на основе МС, различающихся содержанием ауксинов и цитокининов (таблица 1). Влияние фитогормонов на рост и развитие каллусных тканей оценивали при помощи такого параметра как индекс роста (I) (рисунок 2).



Рисунок 2 – Зависимость индекса роста каллусной ткани руты душистой от фитогормонального состава среды культивирования

Выявлено, что индекс роста листовых и стеблевых каллусов зависел от среды культивирования (рисунок 2). При культивировании листовых эксплантов на средах 1–5 (таблица 1) отмечено, что увеличение концентрации 2,4-Д вызывает увеличение индекса роста. Между индексами роста стеблевых каллусов, выращенных на средах 1–3 различия статистически не значимы, но дальнейшее увеличение концентрации 2,4-Д также вызывает возрастание значений индекса роста.

Добавление в среды культивирования цитокинина (БАП) в низкой концентрации (0,1 мг/л) не вызывает статистически значимых изменений индекса роста листовых эксплантов (среды 6–10). Однако индекс роста стеблевых каллусов возрастает с увеличением концентрации в среде 2,4-Д.

Культивирование каллусной ткани руты листового происхождения на средах с одинаковой концентрацией ауксина и цитокинина (среды 11–16) вызывает резкое увеличение индекса роста по сравнению с другими исследованными средами. Наибольшее значение данного параметра достигается на средах 13 (0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л БАП) и 16 (2 мг/л 2,4-Д+2 мг/л БАП). Shabana at al. также наблюдали высокий индекс роста листовых каллусов при культивировании их на среде с концентрацией ауксинов и цитокининов 0,5 мг/л [12]. Индексы роста стеблевых каллусов полученных на средах 11–14 не имели статистически значимых отличий. Однако повышенная концентрация фитогормонов в среде (1,5 и 2 мг/л) отразилось в значительном увеличении индекса роста на средах 15 и 16.

Когда соотношении 2,4-Д:БАП в среде культивирования составляло 2:1 и 1,5:1 (среды 17–19) индекс роста листовых каллусов имел более низкие значения, чем при одинаковом соотношении данных регуляторов роста. Для стеблевых эксплантов такое соотношение фитогормонов в среде культивирования не вызывало снижения индекса роста, данный параметр оставался на таком же уровне, как и при культивировании на средах 15–16.

В спиртовых экстрактах из листьев и стеблей стерильных растений руты душистой отмечалось наличие флавоноидов, о чем свидетельствовали качественные цветные реакции (цианидиновая проба, реакция с хлоридом железа и хлоридом алюминия), проводимые с данными экстрактами. Качественный анализ экстрактов каллусных тканей листового и стеблевого происхождения, полученных на 19 использованных средах, показал, что флавоноиды присутствовали только в экстрактах из каллусов со сред 11 и 12. Листовые экспланты, культивированные на 11 среде, характеризовались слабым развитием каллусной ткани, которая формировалась лишь в местах поранений.

На эксплантах со среды 12 наблюдался активный морфогенез, формировались длинные побеги с зачаточными листьями.

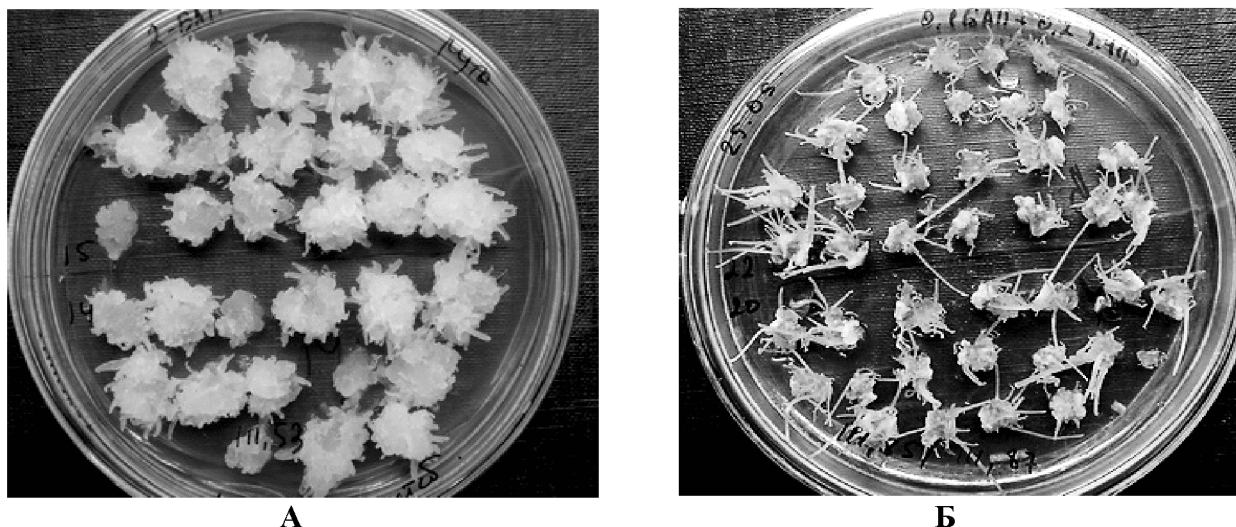


Рисунок 3 – А – Стеблевая каллусная ткань, полученная на среде 16, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л БАП; Б – Образование побегов из стеблевого каллуса на среде 7, содержащей 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП

Таким образом, в данных тканях могли содержаться флавоноиды, накопленные в листьях растения, которые служили источником данных эксплантов.

Для количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах руты душистой использовали спектрофотометрический анализ комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия [10].

Определить содержание флавоноидов в экстрактах из листовых эксплантов со среды 12 не удалось, поскольку данный показатель оказался за пределами концентраций рутина, использованных для построения калибровочного графика.

На рисунке 4 представлено содержание флавоноидов ($X \cdot 10^{-3}$) в экстрактах из руты душистой в пересчете на сухой вес в мг/л. Отмечено, что значительное количество флавоноидов содержится в листья стерильного растения, выращенного в условиях *in vitro*, причем содержание флавоноидов в листьях почти в 4 раза выше, чем в стеблях и 2,5 раза выше, чем в каллусной ткани листового происхождения, выращенных на среде 11, содержащей 0,1 мг/л БАП+0,1 мг/л 2,4-Д.

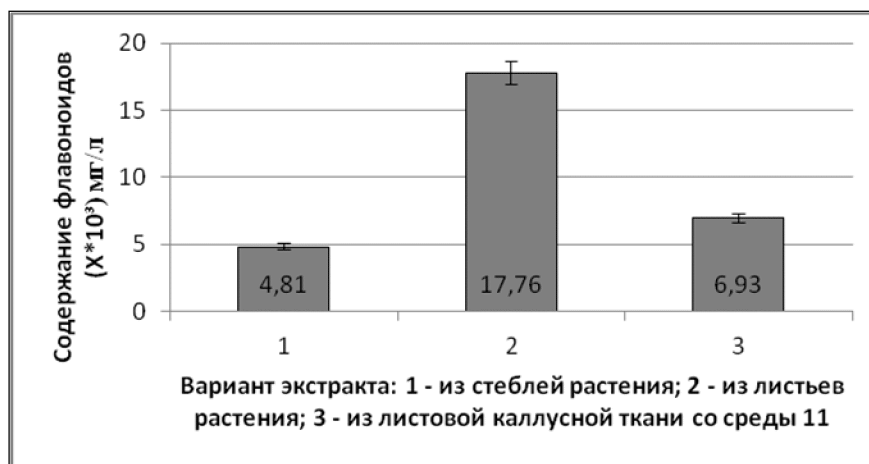


Рисунок 4 – Содержание флавоноидов в спиртовых экстрактах руты душистой

Отсутствие флавоноидов в большинстве исследуемых экстрактов из каллусных тканей можно объяснить тем, что неотсементированные дедифференцированные клетки накапливают, как правило, незначительное по сравнению с интактным растением количество веществ специализированного обмена [13]. Первичные культуры клеток, а нами исследовались именно первичные культуры, могут также содержать незначительные количества вторичных метаболитов или не содержать их совсем [13].

Явление снижения содержания вторичных соединений наблюдалось во многих каллусных культурах: женьшень, маралий корень, живучка, стевия [15]. Однако продуктивность каллусных тканей можно повысить за счет подбора физических и химических условий культивирования (иммобилизация, обработка элиситорами и другое), кроме того с использованием генетической трансформации и других генно-инженерных манипуляций сегодня созданы штаммы-продуценты многих видов растений [13]. Явления соматоклональной вариативности широко распространены среди растений по ряду признаков.

Специализированный отбор соматоклонов с повышенным содержанием вторичных веществ и подбор оптимальных условий культивирования могут позволить также получить штаммы, способные производить достаточное количество флавоноидов. Кроме того, в работах Кузовкиной получены штаммы сверхпродуценты *Ruta graveolens*, синтезирующие акридоновые алколоиды, кумарины и даже вещества, которые не синтезируются *in vivo*, например, рутакридон [16–18].

Выводы

В ходе проведения исследования получена стабильная *in vitro* культура лекарственного растения *Ruta graveolens* L. Введение руты в культуру осуществлялось с использованием семян из коллекции ЦБС НАН Беларуси.

Разработан метод введения в культуру *in vitro* *Ruta graveolens* L. Оценка влияния стерилизации на стерильность семян и их жизнеспособность по критерию всхожести показала, что оптимальным стерилизующим агентом является 0,1% раствор нитрата серебра при времени экспозиции в растворе 20 минут. Разработаны условия культивирования растений и получения каллусных культур стеблевого и листового происхождения. Показана высокая морфогенная активность каллусных культур даже на культуральных средах с высоким содержанием ауксинов. Установлено, что благоприятными для получения каллусной ткани руты душистой стеблевого происхождения являются среды на основе МС, содержащие 1,5 и 2 мг/л 2,4-Д, а также среда обогащенная 2 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. С использованием среды МС, с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л БАП удалось получить каллусную ткань листового происхождения. Изучена биосинтетическая активность каллусных тканей руты душистой и растений в условия *in vitro*. Наибольшее суммарное содержание флавоноидов отмечено в экстрактах из листьев *in vitro* растений; в экстрактах каллусной ткани руты, флавоноиды были обнаружены только в экстрактах каллусов листовых эксплантов, культивированных на среде, содержащей 0,1 мг/л БАП+0,1 мг/л 2,4-Д.

Список литературы

1. Моисеева, Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы в культуре клеток растений / Н.А. Моисеева // Биология культивируемых клеток и биотехнология. – М.: Наука. – 1991. – С. 166–185.
2. Смоленская, И.Н. Пролиферация клеток двух линий суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* / И.Н. Смоленская // Биология культивируемых клеток растений и биотехнология. – Алматы. – 1993. – С. 31.
3. Шамина З.Б. Генетическая изменчивость растительных клеток *in vitro* / З.Б. Шамина // Культура клеток растений, под ред. Бутенко Р.Г. – Киев: Наукова думка. – 1978. – С. 65–68.
4. Атажанов, Д.М. Культура *in vitro* лекарственных растений *Ruta graveolens* L. и *Codonopsis clematidea* Schrenk: автореф. дис. канд. биол. наук: 30.04.97 / Д.М. Атажанов АН Респ. Узбекистан, Ин-т ботаники. – Ташкент, 1997. – 23 с.
5. Курганская, С.А. Рута душистая. / С.А. Курганская // Биология. – 2000. – М.: Первое сентября. – № 25.
6. El-Sherbeny, S.E. Growth and productivity of Rue (*Ruta graveolens*) under different foliar fertilizers application / El-Sherbeny S.E., Khalil M.Y., Hussein M.S // Journal of applied science research. – 2007. – Vol. 3, № 5. – P. 399–407.
7. Miguel, S. Rue in traditional Spain frequency and distribution of its medical and symbolic application / S. Miguel // Economic botany. – 2003. – Vol. 57. – P. 231–244.
8. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов / С.Н. Загребельный. – Новосиб. гос. ун-т, 2000. – 108 с.
9. Корейская, И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны: учеб.-методич. пособие. / И.М. Корейская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова. – Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2007. – 81 с.
10. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А.А. Лобанова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
11. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биология / В.С. Шевелуха. – М.: Высшая школа, 1998. – 412 с.
12. Effect of plant growth regulators and explant type on growth of *Ruta graveolens* L. callus cultures / M.M. Shabana [et al] // Journal of applied science research. – 2000. – Vol. 3, № 5. – P. 299–307.

13. Кунах, В.А. Геномная изменчивость и накопление индолиновых алколоидов в культуре клеток раувольфии змеиной / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1994. – Т. 10, № 1. – С. 3–30.
14. Носов, А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* / А.М. Носов // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, №6. – С. 873–877.
15. Носов, А.М. Культура клеток растений – уникальная система, модель, инструмент. обзор / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 837–844.
16. Акридоновые алколоиды каллусной ткани *Ruta graveolens* / Кузовкина [и др.] // Химия природ. соединений. – 1984. – №6. – С. 758–761.
17. Кузовкина, И.Н. Характеристика штамма каллусной ткани руты душистой, продуцирующего рутакридон / И.Н. Кузовкина, Т.П. Чернышева, И.Е. Альтерман // Физиология растений. – 1979. – Т. 26, № 3. – С.492–499.
18. Кузовкина, И.Н. Образование кумаринов в изолированной корневой ткани руты душистой (*Ruta graveolens* L.):автореф. дис д. биол. наук: 20.05.1975 / И.Н. Кузовкина. АН СССР. Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева. – М., 1975. – 32 с.

**THE GROWTH AND DEVELOPMENT REGULATION OF *IN VITRO* CULTURE
OF *RUTA GRAVEOLENS* L. – THE SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES**

N.S. Buraya, T.I. Fomenko

Central botanic garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

In this study *in vitro* culture of *Ruta graveolens* L. was obtained, optimal conductions for stem and leaf callus propagation were selected and biosynthetic activity of callus cultures and plants grown under *in vitro* conditionals were explored.