

**БИОСИНТЕЗ АНТРАКИНОНОВ В КЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ  
RUBIA TINCTORUM L.**

**М.К. МКРТУМЯН, Ю.Г. ПОПОВ, Е.Н. ЩЕРБАКОВА, А.Г. ПАНОСЯН,  
И.П. КУЗОВКИНА**

*Ереванский государственный университет, кафедра микробиологии и физиологии  
растений, 375049*

Получена кллузная культура марены красильной (*Rubia tinctorum* L.). Подобрана среда, обеспечивающая хороший рост ткани и синтез вторичных метаболитов *in vitro*. Проведенный качественный анализ антрахинонов в экстрактах кллузной ткани марены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показал сопоставимость спектра вторичных метаболитов, синтезируемых *in vitro* кллузной тканью, с составом антрахинонов корней и корневищ целого растения.

Ստացված է տորոնի *Rubia tinctorum* L. կալլուսային կուլտուրան. Ընտրված է մեդիամիջավայր, որն ապահովում է հյուսվածքային կուլտուրայի համեմատաբար լավ աճ և երկրորդային մետաբոլիտների սինթեզ *in vitro* պայմաններում: Շարժը ֆեկրոլիզայանք հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի օգնությամբ տորոնի կալլուսային հյուսվածքի էքստրակտներում որոշված անտրախինոնների որակական անալիզը ցույց տվեց, որ կալլուսային հյուսվածքի կողմից սինթեզված երկրորդային մետաբոլիտների սպեկտրը համընկնում է ամբողջական բույսի արմատների և արմատիկների անտրախինոնների կազմի հետ:

The callus culture of madder (*Rubia tinctorum* L.) was obtained. The nutrient medium for tissue growth and secondary metabolites synthesis *in vitro* was elaborated. The HPLC chromatograms of extracts obtained from the madder callus tissue possessed the similar peaks of anthraquinones with the same retention time as in the extracts from the roots and rhizomes of intact plant.

*Rubia tinctorum* - кллузная культура - антрахиноны

Необеспеченность фармацевтической промышленности естественным сырьем приводит к целесообразности производства последнего биотехнологическим способом. Способность изолированных культур растений сохранять биосинтетические особенности интактных растений дает основание считать их потенциальным источником для получения ценных натуральных соединений. Использование изолированных тканей и клеток растений в качестве источника сырья для производства ценных препаратов не всегда оказывается действительно рентабельным [2,7]. Это связано с некоторыми особенностями культивируемых клеток. Как правило, исходным материалом для получения культуры клеток являются активно пролиферирующие ткани [1], а источником биологически активных веществ *in vivo* - запасяющие органы; кроме того, деление клеток в культуре и вторичный метаболизм разделены по времени [1]. В большей части изученных штаммов изолированных клеток лекарственных растений содержание биологически активных веществ оказывается на порядок ниже, чем в интактных растениях [4]. Хотя некоторые культуры в условиях *in vitro* продуцируют повышенные количества вторичных соединений.

(например, аноскополамин содержится в больших количествах в экстрактах из культур некоторых *Datura spp.*), *in vivo* этот алкалоид присутствует лишь в следовых количествах [5]. И.П. Кузовкиной в Институте физиологии растений РАН также был получен штамм клеток руты душистой, содержащей в 20 раз больше алкалоида рутакридона, чем интактное растение [3].

Марена красильная (*Rubia tinctorum*) - многолетнее лекарственное растение (сем. *Rubiaceae*), корни и корневища которого содержат антрахиноны и их производные. Антрахиноны - обширная группа (более 200 представителей) встречающихся в природе хинонов [6]. Особенно широко они представлены в сем. *Rubiaceae* [10]. Корни марены красильной издревле используются в текстильной промышленности (как красители) и в фармации (как слабительное средство). Лечебные свойства корней обусловлены наличием ализарина (1) - 1,2-дигидрооксантрахинона, его гликозида-руберитриновой кислоты (2) и пурпурина (3), которые обладают диуретическими, спазмолитическими и слабительными свойствами (рис. 1).

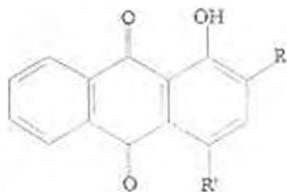


Рис. 1. (1) Ализарин R=OH, R'-H; (2) руберитриновая кислота R=O-primeverose, R'-H; (3) пурпурин R=R'-OH.

Препараты марены красильной способствуют разрыхлению мочевых конкрементов, содержащих фосфаты кальция и магния. Руберитриновая кислота, закисляя мочу, способствует растворению также оксалатов. Ализарин, как основной компонент экстрактов из корней и корневищ марены красильной, может быть использован как индикатор для оценки продукции антрахиноновых метаболитов в культивируемых клетках марены красильной.

**Материал и методика.** Клеточную культуру марены получали из экплантов листового и стеблевого происхождения на среде Мурашиге и Скуга (МС). Модификацией питательной среды удалось добиться относительно хорошего роста и повысить на эффективность синтеза целевого продукта. Полученные каллусы ярко-оранжевого цвета, иногда с красноватыми участками, на свету зелели и имели плотную консистенцию. Поддержание культуры в состоянии непрерывного роста обеспечивалось регулярным (каждые 4 недели) пассированием на среде МС, содержащей (мг/мл) БАН 1, кинетин 1, ГК 0,2, НУК 0,5 при температуре 26° в темноте. Поскольку некоторые вещества в данном случае окрашены, то пассирование сопровождалось набором наиболее интенсивно окрашенных участков. Культивирование каллусов марены ведется более года.

Экстракция антрахинонов из лиофилизированного материала проводилась метанолом (0,2 г материала-трехкратная экстракция 10 мл метанола на ультразвуковой бани в течение 30 мин). Объединенный экстракт фильтровали и доводили метанолом до 100 мл. Концентрацию суммарного антрахинона в каллусной ткани, а также в корнях и корневищах интактного растения марены определяли по калибровочной кривой, построенной для обеспримятого стандарта антрахинонов-ализарина при длине волны 425 нм на регистрирующем спектрофотометре Spexord M40 (Carl Zeiss). Вычисленный по калибровочной кривой молярный коэффициент экстинкции составлял 4293, что сопоставимо с литературными данными [8]. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Silufol UV-254. Разделение в тонком слое осуществляли в системах растворителей хлороформ-уксусная кислота 9:1.

Хроматографический анализ (ВЭЖХ) метанольных экстрактов каллусной ткани марены проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Beckman), состоящем из двух насосов 110В, инжектора 210А, программатора градиента 406 и УФ-детектора. Условия хроматографирования: колонка 250x4мм с фазой Армсфер-С8, элюция антрахинонов

ацетонитрилом в присутствии 4%-ной уксусной кислоты (градиент от 10 до 40%, скорость элюции - 0,8 мл/мин, детекция антрахинонов при 250 нм, скорость бумаги на регистрирующем самописце - 5 мм/мин). В качестве стандарта был использован смесь ализарина и пурпурина (Sigma). В колонку вносили по 30 мкл метанольных экстрактов, разбавленных в 10 раз.

**Результаты и обсуждение.** Антрахиноны относятся к числу вторичных метаболитов, образование которых в растениях не связано с образованием специализированных тканевых структур. Они локализируются в основном в паренхимных клетках коры и корневищ, а также иногда и в стеблевой коре растений. Этим можно объяснить тот факт, что недифференцированно растущие клетки и ткани ряда растений, особенно растений сем. *Rubiaceae*, сохраняют способность к образованию антрахинонов при культивировании *in vitro* [9]. При пролонгированном культивировании (8 недель) каллусная ткань приобретала темно-вишневый оттенок вследствие накопления красителей, которые при более длительном культивировании диффундировали в питательную среду. Содержание суммарного антрахинона в 4 недельной каллусной культуре и в корнях интактного растения, определенное спектрофотометрически, составляло соответственно 49,80 и 39,05 мкг/г сухого веса.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) метанольных экстрактов и сравнении с чистым веществом показала идентичность их хроматографического поведения. Непосредственное сравнение значений  $R_f$  чистого вещества с  $R_f$  ализарина из экстрактов каллусной ткани, корней и корневищ целого растения подтвердило присутствие последнего в каллусной ткани марены (рис. 2).

Первые результаты хроматографического анализа экстрактов каллусной ткани марены на ВЭЖХ также показали наличие алицириглавного компонента антрахинонов корней и корневищ целого растения. Ализарин из экстрактов каллусной ткани имел такие же значения времени удерживания во всех трех пробах, что и ализарин в стандартном растворе (рис. 3).

Хроматограмма показывает сопоставимость качественного состава антрахинонов интактного растения с составом антрахинонов, выделенных из каллусной ткани марены. Остальные компоненты экстрактов за отсутствием метчиков не были идентифицированы.

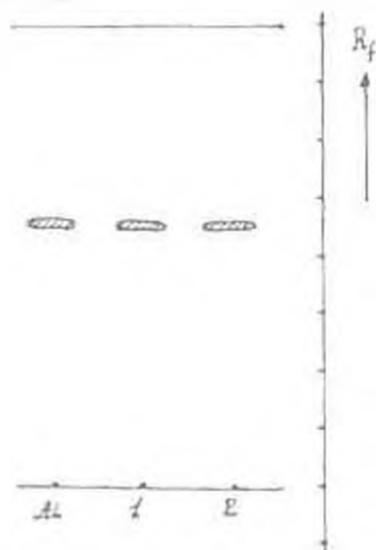


Рис. 2. Тонкослойная хроматография экстрактов из каллусной ткани, корней и корневищ интактного растения марены красильной АЛ-ализарина 1 - экстракт каллусной ткани, 2 - экстракт из корней и корневищ интактного растения.

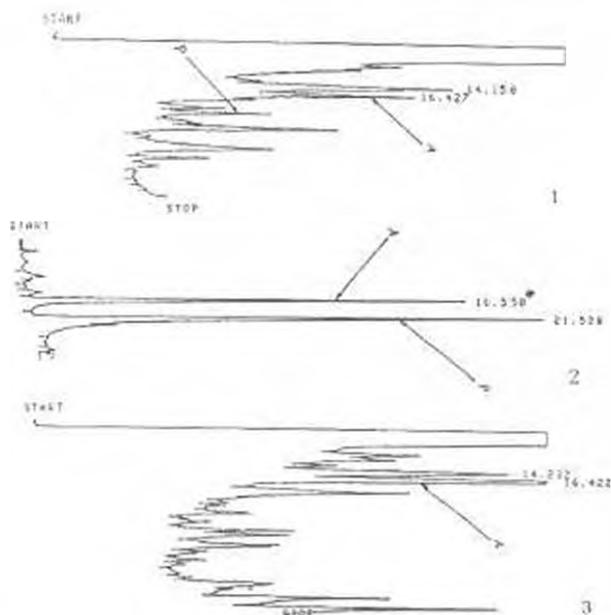


Рис. 3. ВЭЖХ суммарных экстрактов антрахинонов из каллусной ткани, корней и корневищ интактного растения марены красильной. 1 - каллусная культура марены, 2 - стандартный раствор-смесь ализарина и пурпурина, 3 - корни и корневища интактного растения, А - ализарин, Р - пурпурин, \* - время удерживания.

Круглогодичное выращивание в контролируемых условиях каллусной ткани марены даст возможность получать экологически чистое лекарственное сырье. Работа частично финансировалась грантом ИИТАС ЕС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. 272, М, 1964.
2. Бутенко Р.Г. Культура клеток и биотехнология. 3, М., 1986.
3. Культура клеток растений (под. ред. Бутенко Р.Г.), 37, М, 1981.
4. Кузовкина И.Н., Сендрей К., Роса С., Райш И., Раст. ресурсы, 16, 1, 112-118, 1980.
5. Corduan G. Planta Medica Supplement, 22, 1975.
6. Fransis F.J. Pigments and other colourants In Food Chemistry (Fenumera, O.R., ed.) Marcel Decker, New York, 571-580, 1985.
7. Kreis W., Reinhard E. Planta Medica, 55, 4, 409, 1986.
8. Shulte U., El-Shagi H., Zenk M.H. Plant Cell Reports, 3, 1, 51-54, 1984.
9. Strobel J., Hieke M., Gebauer E., Wind E., Groger D. Biochem. Physiol. Pflanzen, 2, 117-124, 1980.
10. Vickery B.L., Vickery B. Secondary Plant Metabolism. The Macmillan Press, Hong Kong, 1-17, 1981.
11. Yeoman M.M., Miedzybrodska M.B., Lindsey K., McLauchlan W.R. The Syntetic Potential of Cultured Plant Cell Cultures: Results and Perspectives/Eds Sala et al. Amsterdam etc.: elsevier, 327, 1980.

Поступила 3.IV.1991