

УДК 573.6.086.835

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРОЙ *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH КОРНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т. И. ДИТЧЕНКО¹⁾, В. М. ЮРИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Разработан протокол получения каллусной культуры эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) из изолированных отрезков корней асептически выращенных проростков в качестве источника эксплантов. Протестировано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 1-нафтилуксусная кислота) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин) для оптимизации прироста биомассы полученной каллусной культуры. Определены уровни накопления гидроксикоричных кислот и флавоноидов в каллусах, культивируемых в присутствии разных комбинаций фитогормонов. Установлено, что модификация минеральной основы питательной среды Мурасиге – Скуга (снижение концентрации нитрата и фосфата, полное исключение аммония) позволяет существенно повысить содержание целевых вторичных метаболитов. Показано отсутствие стимулирующего эффекта сахарозы на уровни накопления фенилпропаноидов и флавоноидов.

Ключевые слова: *Echinacea purpurea* L. Moench; каллус корневого происхождения; индекс роста; фенольные соединения; гидроксикоричные кислоты; флавоноиды.

REGULATION OF PHENOLIC SECONDARY METABOLITES PRODUCTION BY *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH CALLUS CULTURE OF ROOT ORIGIN

T. I. DITCHENKO^a, V. M. YURIN^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: T. I. Ditchenko (ditchenko@bsu.by)

The protocol for obtaining a callus culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench) of root origin from aseptically grown seedlings as a source of explants has been developed. To optimize the growth of callus culture biomass 10 combinations of synthetic auxins (2,4-D, NAA) and cytokinins (kinetin, BAP) have been tested. The levels of hydroxycinnamic acid and flavonoid accumulation in callus, cultivated in the presence of different combinations of phytohormones, are determined. It has been established that modification of the mineral base of the Murashige – Skoog (MS)

Образец цитирования:

Дитченко ТИ, Юрин ВМ. Регуляция продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусной культурой *Echinacea purpurea* L. Moench корневого происхождения. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018;2:57–64.

For citation:

Ditchenko TI, Yurin VM. Regulation of phenolic secondary metabolites production by *Echinacea purpurea* L. Moench callus culture of root origin. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:57–64 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Ивановна Дитченко – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Tatyana I. Ditchenko, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

ditchenko@bsu.by

Vladimir M. Yurin, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

nutrient medium (reduction of nitrate and phosphate concentration, complete exclusion of ammonium) makes it possible to significantly increase the content of a target secondary metabolites. It was shown that there is no stimulating effect of sucrose on the levels of phenylpropanoid and flavonoid accumulation.

Key words: *Echinacea purpurea* L. Moench; callus of a root origin; growth index; phenolic compounds; hydroxycinnamic acids; flavonoids.

Введение

Среди лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, перспективным источником иммуномодуляторов являются представители рода *Echinacea* [1]. Из 11 видов эхинацеи *Echinacea purpurea* L. Moench – лидер по содержанию таких фенилпропаноидов, как гидроксикоричные кислоты (ГКК) и их производные [2]. Помимо иммуностимулирующей активности экстракты эхинацеи пурпурной проявляют тонизирующий, антиоксидантный, противовирусный, противовоспалительный и другие фармакологические эффекты [3; 4]. Биотехнологическим источником фенилпропаноидов могут выступать культуры клеток, тканей и органов *E. purpurea* [5]. В предыдущих исследованиях нами показано, что в водно-этанольных экстрактах из каллусных тканей, так же как и из надземной части растений *E. purpurea*, доминирует цикориевая кислота [6; 7]. При этом использование продукционной питательной среды для культивирования гетеротрофной каллусной культуры приводит к существенному возрастанию уровней накопления не только цикориевой, но и других производных кофейной кислоты, в частности кафтаровой, хлорогеновой. В результате суммарное содержание ГКК вдвое превышает средние уровни их накопления в традиционном лекарственном сырье [6; 7], что позволяет рассматривать полученную культуру в качестве перспективного биотехнологического источника фармакологически ценных фенилпропаноидов.

Наряду с травой эхинацеи пурпурной в медицинских целях используют корневища с корнями [8]. При исследовании уровней накопления ГКК в вегетативных органах эхинацеи пурпурной установлено, что в фазах кущения и бутонизации их содержание находится практически на одном уровне в корнях и листьях растений [9]. Можно предположить, что и культура клеток *E. purpurea*, полученная из корневых эксплантов, будет представлять интерес в качестве продуцента ценных фенилпропаноидов. Несмотря на процесс дедифференциации, предшествующий каллусогенезу и приводящий к упрощению структуры клеток и некоторой их стандартизации, тип экспланта, используемый для инициации каллусной культуры, оказывает существенное влияние на ее ростовые и биосинтетические характеристики. Различное тканевое происхождение клеток экспланта является одной из причин гетерогенности получаемой каллусной ткани, причем некоторые функциональные особенности могут передаваться как стойкие модификации при длительном субкультивировании [10].

Цель настоящей работы – получение каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения и характеристика ее продукционного потенциала в отношении вторичных метаболитов фенольной природы.

Материалы и методы исследований

В качестве источника корневых эксплантов использовали асептически выращенные проростки *E. purpurea* из семян, простерилизованных с помощью хлорсодержащего дезинфицирующего средства Domestos. Процесс получения стерильных семян включал следующие этапы: 1) предварительная стерилизация (промывание семян светло-розовым раствором KMnO_4 в течение 20 мин с последующей обработкой 70 % этанолом в течение 1 мин); 2) собственно стерилизация (инкубация в растворе Domestos); 3) постстерилизация (4–5-кратное промывание стерильной водой); 4) перенос простерилизованных семян в пробирки с безгормональной агаризованной средой по прописи Мурасиге – Скуга (МС) [11]. На этапе собственно стерилизации было протестировано 6 режимов, которые различались по продолжительности воздействия стерилизующего агента Domestos (15 и 30 мин) и его концентрации (50; 33 и 25 % (v/v)). Инкубация простерилизованных семян производилась на питательной среде МС в условиях фитостата с периодичностью освещения 14 ч света / 10 ч темноты при освещенности 5000 лк.

Изоляцию эксплантов осуществляли в условиях ламинар-бокса, с помощью стерильного скальпеля корни разрезали на отрезки длиной 1,0–1,5 см и стерильно переносили на чашки Петри с питательной средой МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и кинетин в концентрациях 1–2 мг/л для индукции каллусогенеза. Инкубацию эксплантов и культивирование каллусов осуществляли в условиях термостата в темноте при 25 °С.

В целях оптимизации состава питательной среды для полученной каллусной ткани корневого происхождения в первой серии экспериментов протестировано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-Д,

1-нафтилуксусная кислота (НУК)) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП)) в среде МС, включающей 30 г/л сахарозы (табл. 1). Все варианты сред были дополнены β-индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в концентрации 2,0 мг/л.

Таблица 1

Комбинации ауксинов и цитокининов в составе питательной среды МС, использованные для оптимизации ростовых параметров каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения

Table 1

Combinations of auxins and cytokinins in the nutrient medium MS, used to optimize the growth parameters of *E. purpurea* callus culture of root origin

Вариант	Тип фитогормона		Концентрация, мг/л	
	Ауксин	Цитокинин	Ауксин	Цитокинин
1	2,4-Д	Кинетин	0,2	0,5
2	2,4-Д	Кинетин	0,5	0,5
3	2,4-Д	Кинетин	1,0	0,5
4	2,4-Д	Кинетин	0,2	1,0
5	2,4-Д	Кинетин	0,5	1,0
6	2,4-Д	Кинетин	1,0	1,0
7	НУК	БАП	0,5	0,5
8	НУК	БАП	1,0	0,5
9	НУК	БАП	0,5	1,0
10	НУК	БАП	1,0	1,0

Во второй серии экспериментов использовали модифицированные варианты питательной среды МС, которые отличались повышенной до 4 % концентрацией сахарозы (вариант 1); половинной концентрацией нитрата и фосфата, исключением аммония (вариант 2); одновременным сочетанием подходов 1 и 2 (вариант 3).

Индекс роста I (отн. ед.) определяли как отношение прироста биомассы каллусов к их начальной массе [12]. Скорость роста v (сут⁻¹) рассчитывали по формуле

$$v = \frac{m_t - m_0}{m_0 \Delta t},$$

где m_t – масса каллуса в конце цикла выращивания, г; m_0 – начальная масса каллуса, г; Δt – продолжительность культивирования, сут.

Содержание суммы фенольных соединений (ФС) в пересчете на феруловую кислоту анализировали на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина – Дениса, флавоноидов (ФЛ) в пересчете на кверцетин – по реакции с $AlCl_3$. Содержание ГКК определяли в пересчете на цикориевую кислоту методом прямой спектрофотометрии согласно [13]. Для количественной оценки указанных показателей использовали каллусные ткани в стационарной фазе ростового цикла.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Microsoft Excel*. Результаты представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($Mean \pm SE$). Достоверность различий между вариантами определяли на основе t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что среди протестированных режимов стерилизации семян *E. purpurea* наиболее эффективным является инкубация в растворе Domestos в концентрации 25 % (v/v) в течение 15 мин. Использование более высоких концентраций дезинфицирующего средства либо увеличение продолжительности стерилизации до 30 мин приводили к резкому снижению жизнеспособности семян.

В результате проращивания простерилизованных семян получали асептические проростки, которые в 3-недельном возрасте использовали в качестве источника корневых эксплантов. Появление первых признаков каллусогенеза на отрезках изолированных корней наблюдалось в среднем через 18–20 сут после их переноса на агаризованные среды МС, включающие фитогормоны. Наиболее активное образование

первичной каллусной ткани *E. purpurea* корневого происхождения происходило на варианте питательной среды, который включал 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина. В данных условиях продолжительность инкубации эксплантов, необходимая для формирования первичной каллусной ткани в объеме, позволяющем провести ее субкультивирование, составляла 40–42 сут.

Поскольку гормональные эффекторы являются важнейшими компонентами питательных сред, оказывающими влияние на процессы пролиферации клеток, далее в работе были протестированы разные комбинации синтетических ауксинов и цитокининов для оптимизации ростовых параметров полученной каллусной культуры *E. purpurea*. При применении 2,4-Д и кинетина (варианты 1–6) установлено, что наиболее высокие значения индекса роста и скорости роста отмечались при использовании питательной среды, включающей 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина на фоне 2,0 мг/л ИУК (табл. 2).

Таблица 2

Влияние разных комбинаций синтетических ауксинов
и цитокининов в составе питательной среды МС на показатели
роста каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения

Table 2

The effect of synthetic auxins and cytokinins combinations
in the nutrient medium MS on the growth parameters
of *E. purpurea* callus culture of root origin

Вариант	<i>I</i> , отн. ед.	<i>v</i> , сут ⁻¹
1	2,44 ± 0,07	0,070 ± 0,004
2	2,81 ± 0,14	0,086 ± 0,004
3	2,58 ± 0,08	0,076 ± 0,005
4	2,10 ± 0,06	0,062 ± 0,004
5	1,58 ± 0,05	0,049 ± 0,003
6	1,83 ± 0,06	0,059 ± 0,005
7	2,84 ± 0,20	0,079 ± 0,006
8	2,36 ± 0,29	0,065 ± 0,008
9	2,28 ± 0,27	0,063 ± 0,007
10	2,46 ± 0,19	0,068 ± 0,005

Повышение концентрации кинетина до 1,0 мг/л при всех использованных концентрациях 2,4-Д приводило к снижению значений ростовых параметров в среднем в 1,6–1,7 раза. Самые низкие величины индекса роста наблюдались для вариантов 5 и 6, поэтому в дальнейшей работе их не применяли.

При варьировании концентраций НУК и БАП значения ростовых параметров изменялись не более чем на 20–25 %. Следует отметить вариант 7, для которого индекс роста и скорость роста каллусов составили (2,84 ± 0,2) отн. ед. и (0,079 ± 0,006) сут⁻¹ соответственно, т. е. практически не отличались от показателей роста каллусов в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Особенность каллусов, выращиваемых в присутствии 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, заключалась в наличии хорошо выраженных признаков вторичной дифференцировки по типу ризогенеза.

Количественный анализ содержания вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения, культивируемых в присутствии разных комбинаций фитогормонов, позволил получить данные, представленные в табл. 3.

В результате культивирования каллусов на средах с разными концентрациями 2,4-Д и кинетина суммарное содержание ФС, а также содержание ФЛ изменялись в узких пределах. Уровни накопления ГКК как доминирующей группы фенольного комплекса варьировали в большей степени – от (4,20 ± 0,19) до (6,00 ± 0,15) мг/г сухого вещества. Наиболее высоким содержанием ФС и ГКК характеризовались каллусы, выращенные в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, в случае ФЛ – в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Снижение концентрации 2,4-Д в питательной среде до 0,2 мг/л сопровождалось достоверным уменьшением анализируемых показателей.

При использовании НУК и БАП более высокое содержание ФС и ГКК отмечалось для каллусов, выращенных в присутствии 0,5 мг/л либо 1,0 мг/л каждого фитогормона, в случае ФЛ – в присутствии концентраций, равных 1,0 мг/л.

Таблица 3

Уровни накопления вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения при варьировании типа и концентрации ауксинов и цитокининов в питательной среде МС

Table 3

Levels of accumulation of phenolic secondary metabolites in *E. purpurea* calluses of root origin by varying the auxins and cytokinins type and concentration in nutrient medium MS

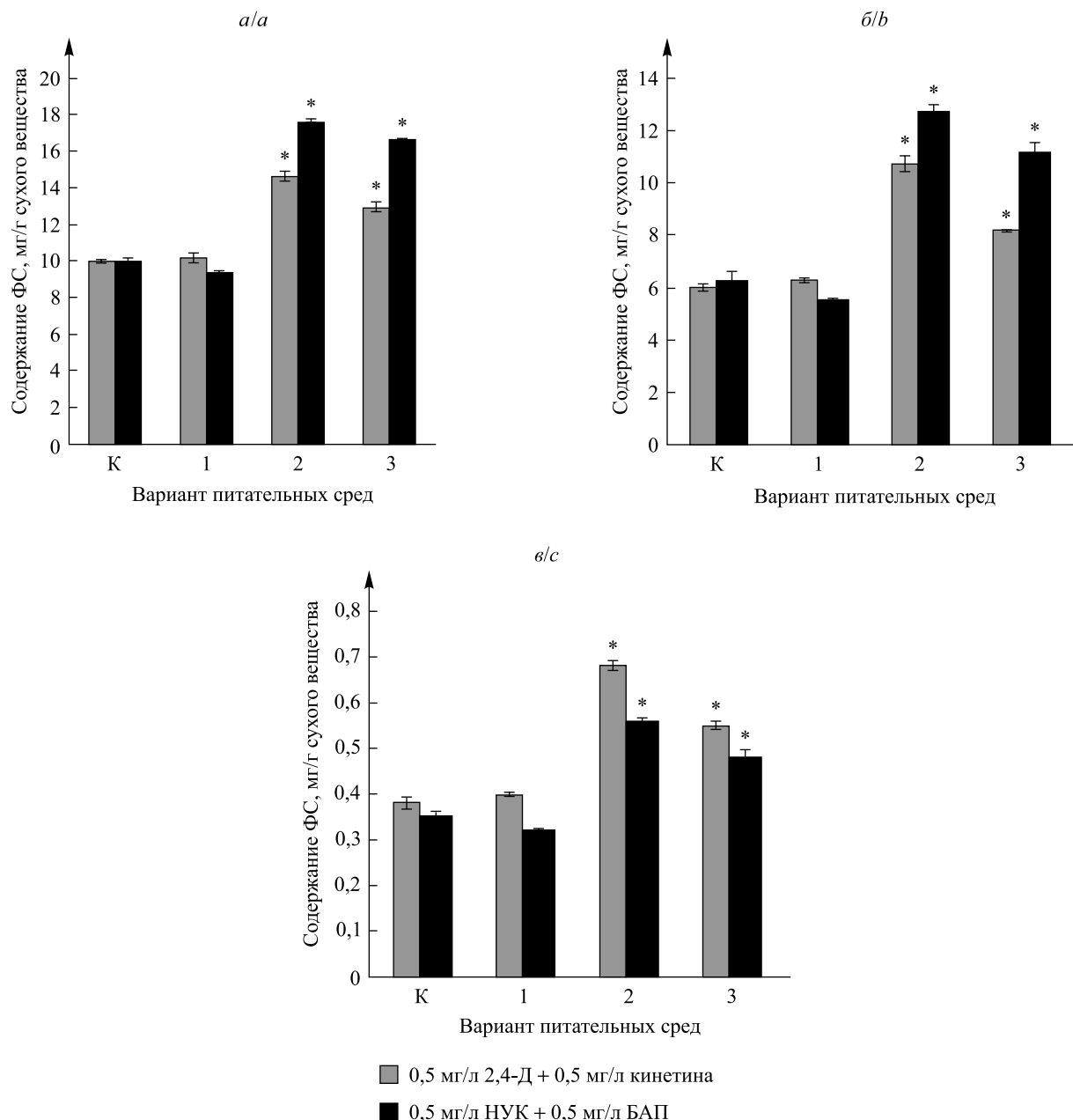
Комбинация фитогормонов	Содержание, мг/г сухого вещества		
	ФС	ГКК	ФЛ
0,2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,15 ± 0,07	5,40 ± 0,17	0,34 ± 0,010
0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,99 ± 0,09	6,00 ± 0,15	0,38 ± 0,013
1,0 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина	9,70 ± 0,29	5,89 ± 0,17	0,40 ± 0,008
0,2 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина	8,59 ± 0,35	4,20 ± 0,19	0,36 ± 0,006
0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	9,98 ± 0,22	6,23 ± 0,41	0,35 ± 0,012
1,0 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	9,34 ± 0,38	5,99 ± 0,06	0,33 ± 0,003
0,5 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП	7,58 ± 0,18	4,42 ± 0,11	0,36 ± 0,030
1,0 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП	9,73 ± 0,28	6,19 ± 0,08	0,44 ± 0,023

Синтетические ауксины 2,4-Д и НУК зачастую оказывают противоположное влияние на уровни накопления вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений [14]. В частности, для каллусной культуры *E. purpurea* листового происхождения исключение из питательной среды 2,4-Д приводило к заметному росту уровней накопления ГКК. Еще более существенное повышение их содержания (в 2,5 раза) отмечалось в результате замены 2,4-Д на НУК [6]. Особенность полученной каллусной культуры *E. purpurea* корневого происхождения состоит в том, что 2,4-Д и НУК в одинаковой степени способствуют реализации не только ее ростового, но и биосинтетического потенциала в отношении ГКК и их производных. Похожая картина имела место в случае каллусной культуры *Camellia sinensis* L., для которой замена 2,4-Д на НУК в составе питательной среды приводила к незначительным изменениям в способности к образованию ФС [15].

Проведенное тестирование влияния разных комбинаций синтетических ауксинов и цитокининов на показатели прироста биомассы и содержание фенилпропаноидов в каллусах *E. purpurea*, инициированных из корневых эксплантов, позволяет выделить два наиболее оптимальных варианта сред, включающих 2,4-Д и кинетин, а также НУК и БАП в концентрациях, равных 0,5 мг/л. В дальнейшей работе эти варианты использованы для поддержания двух стабильных клеточных линий *E. purpurea* корневого происхождения. Следует отметить, что содержание ГКК в отобранных клеточных линиях по своей величине уступает уровням их накопления ((12,1 ± 0,8) мг/г сухого вещества) в каллусной культуре *E. purpurea* листового происхождения [7]. Следовательно, для стимуляции биосинтетического потенциала полученной каллусной культуры требуется оптимизация состава питательной среды, физических параметров, культивирования и др.

Среди компонентов питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей значительное влияние на уровни накопления вторичных метаболитов помимо гормональных эффекторов оказывает обеспеченность источниками углеводного питания (сахароза), макроэлементами (в частности, азот, фосфор) [16]. Для каллусной культуры *E. purpurea*, инициированной из листовых эксплантов, в условиях дефицита азота и фосфора в питательной среде МС на фоне повышенного содержания сахарозы отмечалось резкое возрастание продукции ГКК и их производных [6]. В связи с этим во второй серии экспериментов использовались модифицированные варианты питательной среды МС, которые отличались концентрацией сахарозы, нитратного и аммонийного азота, фосфата. В качестве фитогормонов модифицированные варианты сред включали 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина либо 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП на фоне 2,0 мг/л ИУК.

Как видно из рисунка, дефицит азота и фосфора в питательной среде (вариант 2) приводил к резкому возрастанию уровней накопления суммы ФС в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения. Наиболее высокое содержание ФС ((17,53 ± 0,24) мг/г сухого вещества) отмечалось для каллусов, инкубируемых в присутствии 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Повышенная концентрация сахарозы не вызвала достоверных изменений уровней накопления ФС при использовании полной питательной среды МС (вариант 1), а в условиях дефицита азота и фосфора даже приводила к снижению стимулирующего эффекта (вариант 3).



Уровни накопления суммы ФС (а), ГКК (б) и ФЛ (в) в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения при варьировании состава питательной среды МС:

К – контроль; 1 – повышение концентрации сахарозы до 4 %;

2 – снижение вдвое концентрации нитрата и фосфата, исключение аммония;

3 – сочетание вариантов 1 и 2; * – различия достоверны относительно контроля при $p \leq 0,05$

Accumulation levels of phenolic compounds sum (a), hydroxycinnamic acids (b) and flavonoids (c) in *E. purpurea* calluses of root origin by varying the composition of the nutrient medium MS:

К – control; 1 – increase of sucrose concentration up to 4 %;

2 – halving the concentration of nitrate and phosphate, excluding ammonium;

3 – combination of options 1 and 2; * – differences are reliable, $p \leq 0,05$

При анализе уровней накопления ГКК и их производных были обнаружены аналогичные закономерности. Наиболее высокое содержание ($12,71 \pm 0,28$) мг/г сухого вещества отмечалось для каллусов, инкубируемых на втором варианте питательной среды в присутствии 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Симулирующий эффект дефицита азота и фосфора достигал в среднем 2,0 раза относительно контроля. Повышение концентрации сахарозы до 4 % в этих условиях, наоборот, приводило к ингибированию биосинтетического потенциала культуры.

В отличие от ГКК и суммы ФС наиболее высокое содержание ФЛ в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения отмечалось на втором варианте питательной среды в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д

и 0,5 мг/л кинетина. Повышение концентрации сахарозы оказывало отрицательное влияние на уровни накопления ФЛ в условиях дефицита азота и фосфора независимо от типа используемых ауксинов и цитокининов.

Таким образом, изменение минеральной основы питательной среды МС приводит к более заметным сдвигам в биосинтезе вторичных метаболитов фенольной природы в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения по сравнению с влиянием фитогормонов. Высокое содержание аммонийного и нитратного азота является характерной особенностью питательной среды МС. Ограничение источников азотного питания вплоть до полного исключения аммония заключается в изменении баланса между первичным и вторичным метаболизмом культивируемых растительных клеток в сторону последнего. Для исследуемой каллусной культуры это выражается в практически 2-кратном повышении уровней накопления ГКК и ФЛ. В аналогичных условиях рост содержания ГКК в каллусах *E. purpurea* листового происхождения составлял в среднем 3,5 раза [6].

Достаточно распространенным подходом для увеличения продукции вторичных метаболитов в культурах растительных клеток является использование повышенных концентраций сахарозы [16; 17]. При культивировании каллусной ткани *E. purpurea* листового происхождения на средах с 4 % сахарозой было выявлено возрастание уровней накопления ГКК в 1,5 раза по сравнению с контролем [6]. В случае культуры корневого происхождения использование повышенной концентрации оказалось неэффективным (см. рисунок). Причем на фоне снижения содержания аммонийного и нитратного азота, фосфата добавление в среды 4 % сахарозы приводило к уменьшению величины стимулирующего эффекта дефицита указанных макроэлементов. Для каллусной культуры листового происхождения в аналогичных условиях, наоборот, обнаруживался синергетический эффект [6]. Можно предположить, что указанные различия обусловлены эпигенетическими особенностями каллусных тканей, полученных из эксплантов разного происхождения. В частности, положительное влияние сахарозы проявляется для каллусной культуры, инициированной из фотосинтезирующих тканей. Таким образом, использование стандартных подходов для создания продукционной питательной среды позволило выявить различия в ответных реакциях каллусных культур *E. purpurea* корневого и листового происхождения.

Заключение

Каллусная культура *E. purpurea* корневого происхождения сохраняет способность интактного растения к синтезу таких вторичных метаболитов фенольной природы, как ГКК и ФЛ. Наиболее высокое содержание суммы ФС, в том числе фенилпропаноидов, отмечается в присутствии равных 0,5 мг/л концентраций 2,4-Д и кинетина либо НУК и БАП, тогда как наиболее высокое содержание ФЛ – под влиянием 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Существенное возрастание биосинтетического потенциала исследуемой каллусной культуры в отношении вторичных метаболитов фенольной природы может быть достигнуто за счет модификации минеральной основы питательной среды МС – снижения вдвое концентрации нитрата и фосфата, полного исключения аммония. В условиях дефицита азота и фосфора в питательной среде МС, включающей 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, содержание ФС и ГКК в каллусах *E. purpurea* корневого происхождения возрастает в 1,8–2,0 раза. Аналогичный рост содержания ФЛ отмечается в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Использование повышенной до 4 % концентрации сахарозы не приводит к стимуляции образования ФС. Установленные закономерности регуляции продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусами *E. purpurea* корневого происхождения создают методическую основу для разработки лабораторного регламента наработки биомассы разных линий полученной клеточной культуры с высоким удельным содержанием фармакологически ценных веществ, характеризующихся иммуностимулирующей, адаптогенной, антиоксидантной активностью.

Библиографические ссылки

1. Куркин ВА. Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;12(7):1338–1342.
2. Самородов АВ, Поспелов СВ, Моисеева ГФ, Середа АВ. Фитохимический состав представителей рода эхинацеи и его фармакологические свойства. *Химико-фармацевтический журнал*. 1996;30(4):32–37.
3. Куцук РВ, Зузук БМ, Рыбак ОВ. Иммунокорригирующие и противовоспалительные свойства биологически активных веществ растений рода *Echinacea* Moench. *Провизор*. 2002;5:53–60.
4. Бизунок НА. Фармакологические свойства эхинацеи. *Рецепт*. 2008;5:42–52.
5. Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu C-Z. *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007;43(6):481–492. DOI: 10.1007/s11627-007-9057-2.
6. Дитченко ТИ, Юрин ВМ. Разработка состава продукционной питательной среды для культивирования каллусной ткани эхинацеи пурпурной в качестве источника гидроксикоричных кислот. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2011;6(1):39–46.
7. Дитченко ТИ, Шабуня ПС, Фатыхова СА, Молчан ОВ, Юрин ВМ. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017;7(2):54–63.

8. Куркин ВА. Лекарственные растения как источник импортозамещающих препаратов. *Фундаментальные исследования*. 2013;8(1):139–142.
9. Дойко ИВ, Тихомиров АА, Чепелева ГГ, Леонтьева ВМ. Динамика накопления гидроксикоричных кислот в различных частях растений эхинацеи пурпурной и рудбекии волосистой, выращенных в условиях светокультуры. *Химия растительного сырья*. 2002;3:35–37.
10. Бутенко РГ. *Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе*. Москва: ФБК-ПРЕСС; 1999.
11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
12. Носов АМ. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. В: Ралдугина ГН, Данилова СА, Юрьева НО, Кузнецов ВВ. *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. Москва: БИОНОМ; 2011. с.386–403.
13. Куркин ВА, Авдеева ОИ, Авдеева ЕВ, Мизина ПГ. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea*. *Растительные ресурсы*. 1998;34(2):81–85.
14. Смоленская ИН, Решетняк ОВ, Смирнова ЮН, Черняк НД, Глоба ЕБ, Носов АМ и др. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов. *Физиология растений*. 2007;54:243–252.
15. Николаева ТН, Загоскина НВ, Запрометов НВ. Образование фенольных соединений в каллусных культурах чайного дерева под действием 2,4-Д и 1-НУК. *Физиология растений*. 2009;56(1):53–58.
16. Endress R. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; 1994.
17. Villarreal MO, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158.

References

1. Kurkin VA. Fenilpropanoidy kak vazhneishaya gruppa biologicheskii aktivnykh soedinenii lekarstvennykh rastenii [Phenylpropanoids as the most important group of biologically active compounds of medicinal plants]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015;12(7):1338–1342 (in Russ.).
2. Samorodov AV, Pospelov SV, Moiseeva GF, Sereda AV. Fitokhimicheskie sostav predstavitelei roda ekhinatseya i ego farmakologicheskie svoystva [Phytochemical composition of genus *Echinacea* and its pharmacological properties]. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 1996;30(4):32–37 (in Russ.).
3. Kutsik RV, Zuzuk BM, Rybak OV. Immunokorrigiruyushchie i protivovospalitel'nye svoystva biologicheskii aktivnykh veshchestv rastenii roda *Echinacea* Moench [Immunocorrective and anti-inflammatory properties of biologically active substances of plants of genus *Echinacea* Moench]. *Provizor*. 2002;5:53–60 (in Russ.).
4. Bizunok NA. Farmakologicheskie svoystva ekhinatsei [Pharmacological properties of *Echinacea*]. *Retsept*. 2008;5:42–52 (in Russ.).
5. Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu C-Z. *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007;43(6):481–492. DOI: 10.1007/s11627-007-9057-2.
6. Ditchenko TI, Yurin VM. The development of productional medium for *Echinacea purpurea* callus tissue as a source of hydroxycinnamic acids. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2011;6(1):39–46 (in Russ.).
7. Ditchenko TI, Shabunya PS, Fatykhova SA, Molchan OV, Yurin VM. Analiz proizvodnykh kofeinoi kisloty v kallusnoi kul'ture *Echinacea purpurea* [Analysis of caffeic acid derivatives in *Echinacea purpurea* callus culture]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. 2017;7(2):54–63 (in Russ.).
8. Kurkin VA. Lekarstvennye rasteniya kak istochnik importozameshchayushchikh preparatov [Medicinal plants as a source of import-substituting drugs]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;8(1):139–142 (in Russ.).
9. Doiko IV, Tikhomirov AA, Chepeleva GG, Leont'eva VM. Dinamika nakopleniya gidroksikorichnykh kislot v razlichnykh chastyakh rastenii ekhinatsei purpurnoi i rudbekii volosistoi, vyrashchennykh v usloviyakh svetokul'tury [Dynamics of hydroxycinnamic acid accumulation in various parts of purple coneflower and rudbeckia hirta plants grown under the conditions of light culture]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2002;3:35–37 (in Russ.).
10. Butenko RG. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology]. Moscow: FBK-PRESS; 1999 (in Russ.).
11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
12. Nocos AM. Metody otsenki i kharakteristiki rosta kul'tur kletok vysshikh rastenii [Methods for assessing and characterizing the growth of cell cultures of higher plants]. In: Ralduina GN, Danilova SA, Yur'eva NO, Kuznetsov VV. *Moлекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. Moscow: BIONOM; 2011. p.386–403 (in Russ.).
13. Kurkin VA, Avdeeva OI, Avdeeva EV, Mizina PG. Kolichestvennoe opredelenie summy gidroksikorichnykh kislot v nadzemnoi chasti *Echinacea purpurea* [Quantative determination of the amount of hydroxycinnamic acids in the aerial part of *Echinacea purpurea*]. *Rastitel'nye resursy*. 1998;34(2):81–85 (in Russ.).
14. Smolenskaya IN, Reshetnyak OV, Smirnova YN, Chernjak ND, Globa EB, Nosov AM, et al. Protivopozlozhnoe vliyanie sinteticheskikh auksinov – 2,4-dikhlorfenoksiuksusnoi i 1-naftiluksusnoi kislot na rost kul'tury kletok zhen'shenya nastoyashchego i sintez ginzenozidov [The opposite effect of synthetic auxins – 2,4-dichlorophenoxyacetic and 1-naphthylacetic acid on the growth of ginseng cell culture and ginsenoside synthesis]. *Fiziologiya rastenii*. 2007;54:243–252 (in Russ.).
15. Nikolaeva TN, Zagoskina NV, Zaprometov NV. Obrazovanie fenol'nykh soedinenii v kallusnykh kul'turakh chainogo dereva pod deistviem 2,4-D i 1-NUK [Formation of phenolic compounds in callus cultures of tea tree by action of 2,4-D and 1-NAA]. *Fiziologiya rastenii*. 2009;56(1):53–58 (in Russ.).
16. Endress R. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; 1994.
17. Villarreal MO, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158.

Статья поступила в редакцию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.