

БИОТЕХНОЛОГИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЯТРЫШНИКА ШЛЕМОВИДНОГО – ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

А.И. Лосева, А.В. Позднякова, А.Ю. Просеков,
Е.В. Остапова, О.Г. Альтшулер

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия

Одним из востребованных в фармакологической сфере растением является *Orchis maculata* L., содержащий алкалоиды, флавоноиды, каротиноиды, антоцианы и стеринны – вещества, проявляющие биологически активное действие. На территории России данный вид занесен в Красную книгу, следовательно, актуально использовать биотехнологические методы выращивания *in vitro*. Данная работа направлена на подбор фитогормонов в питательной среде для получения максимального прироста биомассы каллусной культуры *in vitro*. Объектом исследования стала 28-дневная каллусная культура *Orchis maculata* L., выращенная на различных питательных средах: основа среда Мурасиге-Скуга, варьирование количеством фитогормонов (от 0,1 мг до 2,0 мг) – цитокинов (кинетин, 6-БАП) и ауксинов (ИМК, 2,4-Д). Из каллусных клеток, обладающих наибольшим сухим остатком, получали экстракт (экстрагент – 70 % этанол, продолжительность 60 мин, температура 60 °С, соотношение сырье:экстрагент – 1:10). Спиртовой экстракт подвергался анализу на определение качественного и количественного состава БАВ с помощью ВЭЖХ (Shimadzu LC-20 Prominence) и ТСХ (Sorbfil ПТСХ-АФ-А). Наибольший прирост биомассы каллуса наблюдается при соотношении цитокин:ауксин – 1:1. На 28 сутки культивирования индекс роста = $11,71 \pm 0,01$ наблюдался при использовании 6-БАП+2,4-Д (1,0 мг + 1,0 мг на 1 л), на питательной среде № 29. Наибольшее содержание сухих веществ ($23,81 \pm 0,02$ %) наблюдалось при использовании среды № 13: кинетин (1,5 мг)+2,4-Д (1,5 мг). Методом ТСХ в этанольном экстракте каллусных клеток (выращенных на среде № 13) было обнаружено содержание кверцетина и кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозидов в трисахаридной и дисахаридной форме. Методом ВЭЖХ – рутин (73,07 ± 3,65 мг/кг), кверцетин (15,08 ± 0,75 мг/кг), апигенин (23,63 ± 1,18 мг/кг), колеофолид (12,53 ± 0,63 мг/кг). Представленная в данной работе питательная среда позволит получать каллусную культуру *Orchis maculata* L. для дальнейшего извлечения из нее БАВ, представляющих интерес в целях здравоохранения.

Ключевые слова: ятрышник, салеп, биотехнология *in vitro*, каллус, фитогормоны, биологически активные вещества, алкалоиды, флавоноиды, каротиноиды, антоцианы, стеринны.

Введение

Орхидеи (семейство Орхидные) являются важным источником биологически активных веществ (БАВ), используемых в целях здравоохранения: в составе фармацевтических и пищевых продуктов [1]. Интерес представляет ятрышник пятнистый или дактилориза пятнистая (*Orchis maculata* L. или *Dactylorhiza maculata* L.), прорастающая на территории Сибирского федерального округа. Клубни, корни, цветы, листья данного многолетнего травянистого растения [2] часто использовались в народной медицине: для лечения воспалений, расстройств желудка, в качестве афродизиака, источника противоопухолевых, антиоксидантных, иммуномодулирующих и противовирусных веществ [3]. Популярным функциональным напитком на основе муки из клубней ятрышника в странах Ближнего Вос-

тока являлся «салеп» (данный термин означает и клубни наземных орхидей). Из муки клубней также изготавливаются пудинги, мороженое, желе, супы и тесто [4, 5].

Обширное воздействие ятрышника на организм человека обусловлено содержанием в нем БАВ. Важным компонентом растения является слизь (в состав которой входит глюкоманнан [3]), фармацевтическое действие также оказывают алкалоиды, флавоноиды, каротиноиды, антоцианы и стеринны [6].

Из-за эколого-биологических особенностей (слабое размножение с помощью семян, микотрофность, низкая конкурентоспособность и прочие особенности, представленные в работе Л.Н. Ковригина и ее коллег [7]), из-за популярности, востребованности среди населения растения семейства *Orchis* находятся под угрозой исчезновения и занесены в Крас-

ную книгу России. Следовательно, для сохранения их разнообразия и дальнейшего устойчивого использования в целях здравоохранения актуально прибегать к биотехнологическим методам размножения *in vitro*, например, к каллусогенезу [8, 9]. Каллусную ткань – ткань, состоящую из популяции дедифференцированных клеток, используют как для отбора растений, проявляющих улучшенные признаки, так и для максимального синтеза БАВ [10]. Для инициации каллусогенеза важную роль играют фитогормоны, точнее концентрация и содержание в питательных средах ауксинов и цитокинов [11].

Цель данной работы заключается в подборе оптимального фитогормонального состава питательной среды для получения максимальной биомассы каллусной культуры ятрышника пятнистого.

Объекты и методы

Объектом исследования являлась биомасса каллусных культур ятрышника пятнистого (*Orchis maculata* L.). Для получения эксплантов использовали стерильные семена, приобретенные в коллекции Е.К. Сироткина (Россия). Перед стерилизацией семена предварительно подвергались стратификации – их выдерживали при +4 °С в течение двух недель [8]. Стерилизацию семян осуществляли с помощью выдерживания в 70 % этаноле в течение 2 мин, затем в 15 % перекиси водорода – 3 мин, с последующей двукратной промывкой в стерильной дистиллированной воде [12]. Промытые семена подсушивали в потоке стерильного воздуха на стерильной фильтровальной бумаге. После стерилизации для получения проростков семена высаживали на агаризованную среду Кнудсона (ООО ТД «ХИММЕД», Россия) в чашки Петри диаметром 60 и 90 мм.

Полученные 4-недельные стерильные проростки (а именно листья и стебли) использовали для индукции каллусных клеток. Экспланты помещали на стерильные питательные среды, состав которых представлен в табл. 1. Все реактивы приобретены в ООО «Диаэм» (Россия). Питательные среды автоклавировали при 15 мин подготовительного и 15 мин основного режима при добавочном давлении 0,7–0,8 атм. Колбы, инструменты стерилизовали в течение 60 минут при 180 °С в сухожаровом шкафу. Все работы проводились в стерильных условиях ламинар-боксов БМБ-II-

«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC (ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

На основании проведенного литературного обзора в качестве базальной среды была выбрана среда Мурасиге-Скуга [14]. Для стимулирования деления клеток выбраны фитогормоны: ауксины (2,4-Д и ИМК [12, 15]) и цитокины (6-БАП и кинетин [12, 16].) Сначала осуществлялся подбор цитокина, способствующего делению клеток, затем подбор ауксина, стимулирующего данное деление клеток.

Культивирование осуществлялось в климатической камере (KBF 720, Binder, Германия) в течение 7, 14, 21, 28 и 35 суток при 16 часовом фотопериоде, при 26 ± 1 °С [1].

Индекс роста и содержание сухого вещества в каллусной биомассе определялись для того, чтобы установить оптимальный фитогормональный состав среды. Индекс роста (I) каллусных культур определялся по формуле [17]:

$$I_i = \frac{m_i - m_0}{m_0}, \quad (1)$$

где m_i – масса каллусной культуры на i -е сутки выращивания, г; m_0 – начальная масса каллусной культуры (равная 0,1 г), г.

Для определения содержания сухого вещества определяли сухую массу клеток каллуса. Каллус высушивали при 105 °С до постоянной массы в анализаторе влажности Mb23 (Ohaus, США) [17]:

$$X = \frac{m_{\text{сухая}}}{m_{\text{сырая}}} \times 100 \%, \quad (2)$$

где $m_{\text{сухая}}$ – масса каллусной культуры высушенной до постоянной массы, г; $m_{\text{сырая}}$ – начальная масса каллусной культуры.

Литературный обзор позволил выделить только одну работу, в которой анализировался состав БАВ ятрышника пятнистого – работа Sukchikh et al. [18]. Данная работа использовалась как источник методик по экстракции БАВ из биоматериала и данных о количественном и качественном содержании БАВ в растении. Из сухой биомассы (в данной работе использовали 28-дневные культуры) каллусных клеток ятрышника пятнистого получали экстракт: в качестве экстрагента использовался 70 % этанол, температура экстракции составляла 60 °С, продолжительность процесса – 60 мин, соотношение сырье:экстрагент – 1:10. Анализ БАВ осуществлялся с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) согласно ОФС.1.2.1.2.0003.15. ТСХ хроматографию выполняли на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А

Таблица 1
Состав питательных сред (на 1 л), используемых для выращивания каллусной культуры
ятрышника пятнистого

№	Базальная среда	Кинетин, мг	6-БАП, мг	ИМК, мг	2,4-Д, мг	pH	Агар-агар
1	MS	–	–	–	–	5,6–5,8	20,0 г
2		0,1	–	0,1	–		
3		0,1	–	–	0,1		
4		0,5	–	0,5	–		
5		0,5	–	–	0,5		
6		0,5	–	1,0	–		
7		0,5	–	–	1,0		
8		1,0	–	0,5	–		
9		1,0	–	–	0,5		
10		1,0	–	1,0	–		
11		1,0	–	–	1,0		
12		1,5	–	1,5	–		
13		1,5	–	–	1,5		
14		1,5	–	1,0	–		
15		1,5	–	–	1,0		
16		1,0	–	1,5	–		
17		1,0	–	–	1,5		
18		2,0	–	2,0	–		
19		2,0	–	–	2,0		
20		–	0,1	0,1	–		
21		–	0,1	–	0,1		
22		–	0,5	0,5	–		
23		–	0,5	–	0,5		
24		–	0,5	1,0	–		
25		–	0,5	–	1,0		
26		–	1,0	0,5	–		
27		–	1,0	–	0,5		
28		–	1,0	1,0	–		
29		–	1,0	–	1,0		
30		–	1,5	1,5	–		
31		–	1,5	–	1,5		
32		–	1,5	1,0	–		
33		–	1,5	–	1,0		
34		–	1,0	1,5	–		
35		–	1,0	–	1,5		
36		–	2,0	2,0	–		
37		–	2,0	–	2,0		

MS – среда Мурасиге-Скуга [13]; 6-БАП – 6-бензиламинопурин; ИМК – индолилмасляная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

с последующей денситометрией ТСХ пластины Sorbsil. Использовали денситометр с системой фотофиксации Soni (ООО «ИМИД», Россия). Хроматографические зоны вырезали и подвергали дальнейшему анализу – препаративной ВЭЖХ, используя элюент метиленхло-

рид:метанол в соотношении 4:1 [18]. Количество содержания исследуемых растительных биологически активных веществ определяли с помощью калибровочных кривых, построенных в диапазоне концентраций 0,05–200 мкг/мл. И с помощью ВЭЖХ на хроматографе

Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu Corp., Япония) с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD-20-MA (Shimadzu Corp., Япония) и рефрактометрическим детектором RID-10A (Shimadzu Corp., Япония). Использовалась хроматографическая колонка Kromasil 5 мкм C18, 250×4,6 мм (Akzo Nobel Pulp and Performance Chemicals AB, Швеция); предколонка Security Guard Gartridge (Phenomenex, США), объём инъекции 20 мкл. Температура колонки 300 °С. Режим элюирования изократический, ПФ состоит – AcCN: ИПС: H₂O-N₃PO₄ (20:5:75 pH 3.5).

Обработка полученных данных осуществлялась в программе Microsoft Excel. В табл. 2, 3 приведены значения в виде «средние арифметические величины полученных параметров и их стандартное отклонение». Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для оценки достоверности результатов исследования использовали t-критерий (критерий Стьюдента).

Результаты и их обсуждения

Первые проростки из семян растения наблюдались через 4 недели культивирования. Образование первичных каллусов из проросших стерильных семян на рассматриваемых питательных средах наблюдалось на 7–14 сутки культивирования (рис. 1). Результаты культивирования индекс роста и содержания сухого вещества представлены в табл. 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что от выбора фитогормона (типа, концентрации) зависит калусогенез и образование органов в культурах *in vitro*. Полученные данные не противоречат данным, полученным в ходе литературного обзора [11]: недостаток цитокинов в сравнении с ауксинами стимулирует образование корней, недостаток же ауксинов – побегов из эксплантов. Из получен-

ных данных видно, что наибольшее накопление каллусных клеток наблюдается при соотношении цитокин:ауксин – 1:1. Установлено, что наибольший прирост клеток за 14 дней культивирования наблюдается при использовании 6-БАП и 2,4-Д (1,0 мг + 1,0 мг соответственно). На питательной среде № 29 индекс роста составил $7,71 \pm 0,01$. Но несмотря на максимальный клеточный прирост, наибольшее содержание сухого вещества в клетках наблюдалось при использовании среды № 13, то есть при добавлении кинетина и 2,4-Д (1,5 мг + 1,5 мг соответственно).

Применение 2,4-Д в концентрации выше 1,5 мг/л на 35 сутки культивирования привело к преждевременному старению каллусной культуры, в сравнении с использованием ИМК с такой же концентрации. За контроль принята безгормональная среда MS (№ 1), на которой происходило незначительное, спонтанное образование каллуса на 28 день культивирования.

Прирост биомассы каллусных клеток, выросших на средах № 13 и № 29 представлен на рис. 2.

Кривая роста имеет S-образную форму, с выраженными ростовыми фазами: стационарная фаза роста наблюдалась до 28 суток, после которых началась деградация культуры.

Результаты изучения качественного и количественного состава БАВ в биомассе полученных каллусных культур *in vitro* ятрышника пятнистого представлены на рис. 3.

Методом ТСХ обнаружено наличие содержание кверцетина и кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозидов в трисахаридной и дисахаридной форме.

В результате препаративной ВЭЖХ обнаружено наличие рутина, апигенина, кверцетина и гликозид-кверцетинов (рис. 4, табл. 3).

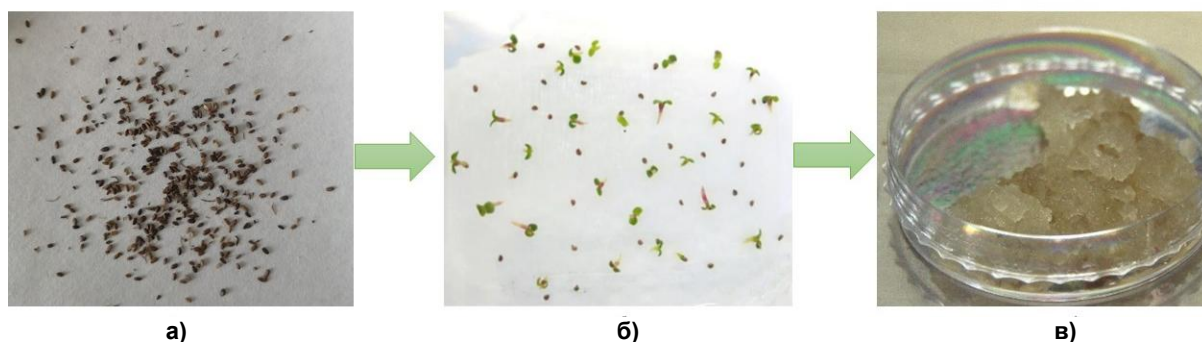


Рис. 1. Последовательность этапов каллусообразования из стерильных семян ятрышника пятнистого: а) стерильные семена; б) проросшие семена в) каллусные клетки

Таблица 2
Влияние фитогормонов на каллусогенез и образование органов, на накопление биомассы каллуса
(28-дневного) и содержание в нем сухого вещества

№	Ризогенез	Геммагенез	Каллусогенез	Индекс роста	Содержание сухого вещества, %
1	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–
4	–	–	+	48,21 ± 0,01	19,78 ± 0,01
5	–	–	+	8,43 ± 0,01	19,57 ± 0,03
6	+	–	+	9,30 ± 0,02	15,53 ± 0,04
7	+	–	+	9,51 ± 0,01	20,00 ± 0,04
8	–	+	+	8,90 ± 0,02	22,22 ± 0,03
9	–	+	+	9,16 ± 0,01	10,79 ± 0,04
10	–	–	+	10,26 ± 0,01	9,64 ± 0,01
11	–	–	+	10,90 ± 0,02	9,08 ± 0,02
12	–	–	+	11,41 ± 0,01	21,77 ± 0,03
13	–	–	+	11,62 ± 0,01	23,81 ± 0,02
14	–	+	+	9,18 ± 0,02	12,38 ± 0,04
15	–	+	+	9,44 ± 0,02	13,46 ± 0,03
16	+	–	+	9,74 ± 0,02	13,64 ± 0,03
17	+	–	+	10,01 ± 0,03	13,36 ± 0,01
18	–	–	+	11,10 ± 0,02	20,66 ± 0,01
19	–	–	+	11,23 ± 0,01	8,28 ± 0,01
20	–	–	–	–	–
21	–	–	–	–	–
22	–	–	+	8,81 ± 0,01	21,73 ± 0,02
23	–	–	+	9,52 ± 0,01	21,50 ± 0,01
24	+	–	+	9,71 ± 0,01	13,55 ± 0,03
25	+	–	+	9,84 ± 0,02	22,87 ± 0,03
26	–	+	+	9,32 ± 0,01	20,19 ± 0,01
27	–	+	+	9,41 ± 0,02	20,05 ± 0,01
28	–	–	+	10,91 ± 0,02	16,89 ± 0,01
29	–	–	+	11,71 ± 0,01	23,62 ± 0,02
30	–	–	+	11,34 ± 0,01	22,36 ± 0,01
31	–	–	+	11,25 ± 0,02	22,46 ± 0,01
32	–	+	+	10,53 ± 0,01	23,04 ± 0,01
33	–	+	+	10,27 ± 0,02	23,57 ± 0,02
34	+	–	+	10,31 ± 0,01	23,54 ± 0,03
35	+	–	+	10,60 ± 0,02	23,10 ± 0,04
36	–	–	+	11,11 ± 0,01	22,31 ± 0,02
37	–	–	+	11,31 ± 0,01	22,11 ± 0,04

MS – среда Мурасиге-Скуга; 6-БАП – 6-бензиламинопурин; ИМК – индолилмасляная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; «+» – наблюдается каллусогенез или образование органов; «–» – не наблюдается каллусогенез или образование органов.

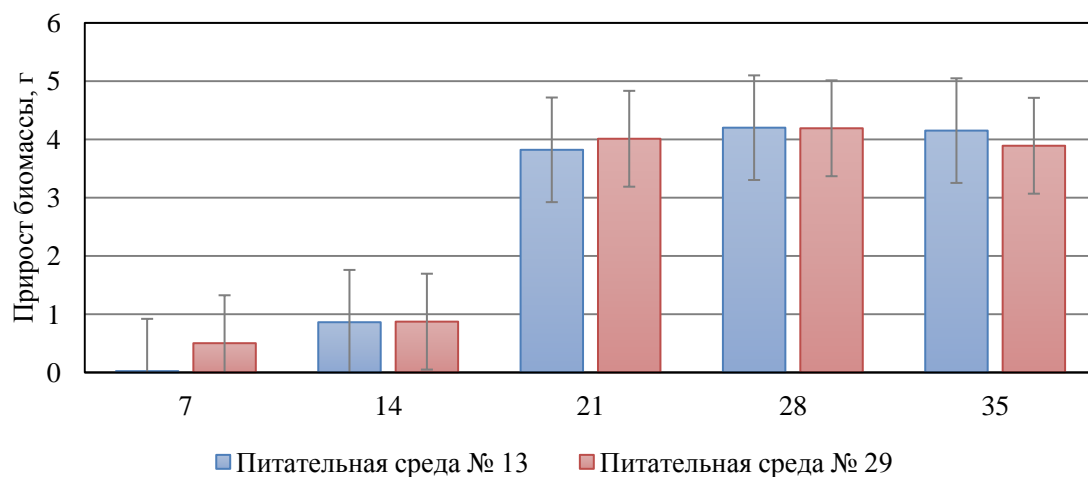


Рис. 2. Прирост биомассы каллусных клеток за 35 дней культивирования на питательной среде № 13 и № 29



Рис. 3. Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, выделенных из высушенной биомассы каллусных культур *in vitro* ятрышника пятнистого методом ТСХ

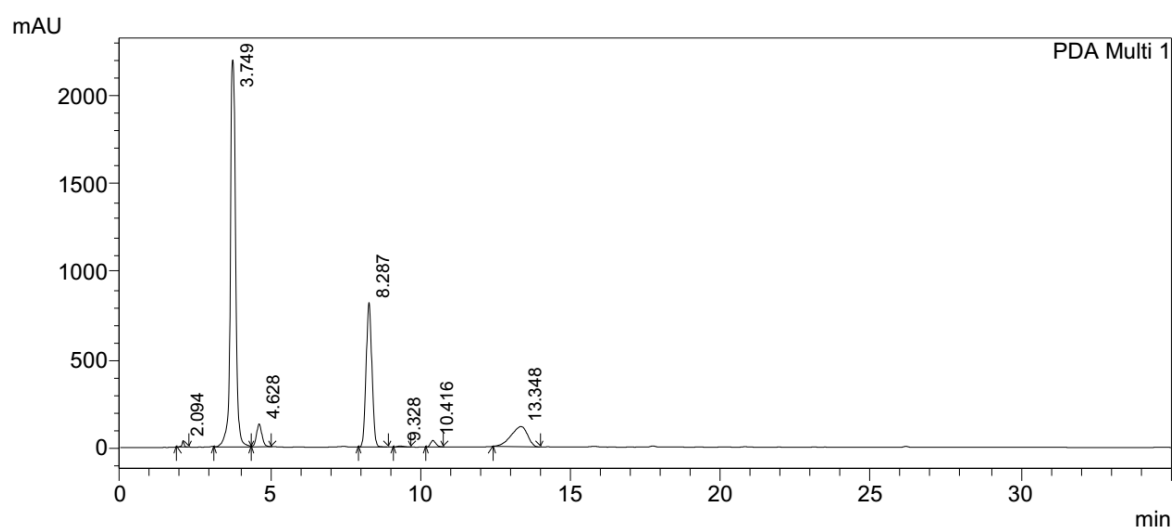


Рис. 4. Результаты препаративной ВЭЖХ экстракта ятрышника пятнистого

Таблица 3
Содержание БАВ в биомассе каллусной
культуры ятрышника пятнистого

Наименование БАВ	Содержание БАВ, мг/кг
Рутин	73,07 ± 3,65
Кверцетин	15,08 ± 0,75
Апигенин	23,63 ± 1,18
Колеофолид	12,53 ± 0,63

В результате было обнаружено наличие: рутина, апигенина, кверцетина и гликозид-кверцетина.

В каллусных клетках ятрышника пятнистого, культивируемых на питательной среде № 13, преобладал рутин. Сравнивая полученные значения с качественным и количественным составом БАВ, обнаруженных в статье Sukchikh et al. [18] видно, что:

– экстракт из каллусных клеток содержит апигенин и колеофолид;

– количество рутина в каллусе содержится меньше примерно на 12,1, а количество кверцетина меньше в 7,3 раза, чем в экстракте из побегов/листьев/цветов растения;

– в экстракте из органов растения содержится 3,3'; 4'; 5,5'; 7-гексагидроксифлавонон, 3,3'; 4'; 5,5'; 7-гексагидроксифлавонон-3-О-гликозид, галловая и феруловая кислоты.

Несоответствие в количественном и качественном составе БАВ можно объяснить тем, что в данном эксперименте проанализирована каллусная культура, выращенная лишь в течение 14 дней. При больших объемах биомассы – наблюдается больший выход БАВ. К тому же для извлечения БАВ использовалась только этанольная экстракция, в дальнейшем можно использовать различные экстрагенты, их соотношения, варьировать температурой и продолжительностью экстракции.

Вывод

Применение биотехнологических методов по выращиванию растений в условиях *in vitro* позволяет получать БАВ, не извлекая растение из естественных условий обитания. В ходе данной работы была подобрана питательная среда, фитогормональный состав которой позволял накопить максимальное количество биомассы каллусной культуры ятрышника пятнистого в условиях *in vitro*. В каллусной культуре обнаружено содержание рутина (73,07 ± 3,65 мг/кг), кверцетина (15,08 ± 0,75 мг/кг), апигенина (23,63 ± 1,18 мг/кг), колео-

фолида (12,53 ± 0,63 мг/кг) – БАВ, проявляющих функциональную активность: антиоксидантные, противовоспалительные, противораковые и другие свойства. То есть экстракты ятрышника пятнистого или выделенные из них индивидуальные БАВ актуально использовать в качестве пищевых добавок, компонентов функциональных продуктов для поддержания здорового состояния организма потребителя. Для наибольшего выделения БАВ в перспективе из каллусных клеток получать суспензии и корневые культуры *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», соглашение № 075-02-2018-223 от 26.11.2018, № 075-15-2019-1362 от 14.06.2019 (идентификатор проекта RFMEFI57718X0285).

Литература

1. Gantait S., Das A., Mitra M., Chen J.T. Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology // South African Journal of Botany. 2021. Vol. 139. P. 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.015>.
2. Henneresse T., Tyteca D. Insect Visitors and Potential Pollinators of *Orchis militaris* (Orchidaceae) in Southern Belgium // Journal of insect science (Online). 2016. Vol. 16(1). P. 104. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew088>.
3. Nuerxiati R., Abuduwaili A., Mutailifu P., Wubulikasimu A., Rustamova N., Jingxue C., Aisa H. A., Yili A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep) // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 141. P. 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.112>.
4. Салманова, Р. К. Использование Ятрышников флоры Нахчыванской автономной республики в народной медицине // Вестник современных исследований. 2018. № 10.3(25). С. 86–87.
5. Tekinşen K.K., Güner A. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species // Food Chemistry. 2010. Vol. 121. Issue 2. P. 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.066>.
6. Hossain M. M., Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances – An overview

// Fitoterapia. 2011. Vol. 82. Issue 2. P. 102–140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>.

7. Ковригина Л.Н., Филиппова А.В., Романова Н.Г., Монгуш Б.О. Охраняемые орхидные в Кемеровском районе // Вестник Кемеровского государственного университета. Серия: Биологические, технические науки и науки о Земле. 2017. № 4. С. 4–8. DOI: 10.21603/2542-2448-2017-4-4-8.

8. Popova E., Kim H.H., Saxena P.K., Florent Engelmann, Hugh W. Pritchard, Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity // Biotechnology Advances. 2016. Vol. 34. Issue 4. P. 380–403. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.001>.

9. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза in vitro у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 5. С. 273–288. DOI: 10.1134/S0475145018050038.

10. Гвасалия М.В., Маляровская В.И., Рахмангулов Р.С. Влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза in vitro растений чая (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2020. № 2(61). С. 51–56.

11. Молчан О.В., Юрин В.М. Влияние фитогормонов на каллусогенез и ростовые характеристики культур in vitro *Vinca major* L. // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2016. Т. 11. № 1. С. 162–169.

12. Шейко Е.А. Редкие виды орхидей умеренной зоны и современные методы их эффективного сохранения в искусственных условиях // Живые и биокосные системы.

2013. № 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-3>

13. Murashige T., Scoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture // Physiology Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

14. Yeow L.C., Chew B.L, Sreeramanan S. Elevation of secondary metabolites production through light-emitting diodes (LEDs) illumination in protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium* hybrid orchid rich in phytochemicals with therapeutic effects // Biotechnology Reports. 2020. Vol. 27. P. e00497. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00497>.

15. Lee P.L., Chen J.T. Plant regeneration via callus culture and subsequent in vitro flowering of *Dendrobium huoshanense* // Acta Physiologiae Plantarum. 2014. Vol. 36. P. 2619–2625. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1632-7>.

16. Bhattacharyya P., Kumaria S., Diengdoh R., Tandon P. Genetic stability and phytochemical analysis of the in vitro regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid // Meta Gene. 2014. Vol. 2. P. 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.06.003>.

17. Филиппова С.Н., Дитченко Т.И., Логвина А.О., Юрин В.М. Разработка эффективных способов депонирования каллусных культур ценных лекарственных растений // Труды БГУ. 2015. Т. 10. № 1. С. 205–220.

18. Sukhikh S., Noskova S., Ivanova S., Skrypnik L., Pungin A., Ulrikh E., Chupakhin E., Babich O. Study of the Properties of In Vitro *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Family Orchidaceae) // Extracts. Plants (Basel, Switzerland), 2021. Vol. 10(7). P. 1330. <https://doi.org/10.3390/plants10071330>.

Лосева Анна Ивановна, кандидат технических наук, начальник Управления научно-издательской деятельности, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово), losevaa@mail.ru

Позднякова Анна Владимировна, кандидат технических наук, доцент кафедры бионанотехнологии, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово).

Просеков Александр Юрьевич, доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой бионанотехнологии, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово).

Остапова Елена Владимировна, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры фундаментальной и прикладной химии, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово).

Альтшулер Ольга Генриховна, доктор химических наук, доцент, профессор кафедры общей и экспериментальной физики, Кемеровский государственный университет (г. Кемерово).

Поступила в редакцию 23 августа 2021 г

CALLUS *ORCHIS MACULATA* L. AS A SOURCE OF BIOACTIVE SUBSTANCES: BIOTECHNOLOGY OF CULTIVATION

A.I. Loseva, A.V. Podznyakova, A.Yu. Prosekov,
E.V. Ostapova, O.G. Altshuler

Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Orchis maculata L. is a medicinal plant that contains alkaloids, flavonoids, carotenoids, anthocyanins, and sterols. However, this plant is listed in the Red Book of Russia. Therefore, domestic pharmacology needs *in vitro* biotechnological methods for its industrial cultivation. The research objective was to select phytohormones in a nutrient medium that would increase the callus biomass of *Orchis maculata* L. The study featured callus cultures grown on various nutrient media and such phytohormones as cytokines (kinetin, 6-BAP) and auxins (BCI, 2,4-D). The amount of the phytohormones varied from 0.1 mg to 2.0 mg. The callus cells with the highest dry residue were subjected to extraction with 70 % ethanol at 60 °C for 60 min; the ratio of raw materials : extractant was 1:10. The extract was analyzed for the qualitative and quantitative composition of biologically active substances using HPLC (Shimadzu LC-20 Prominence) and TLC (Sorbfil PTSKh-AF-A). The greatest increase in callus biomass was observed when the ratio of cytokine: auxin was 1:1. On cultivation day 14, the growth index was 7.71 ± 0.01 when using 6-BAP + 2,4-D (1.0 mg + 1.0 mg per 1 L) on nutrient medium No. 29. Medium No. 13, kinetin (1.5 mg) + 2,4-D (1.5 mg), provided the highest amount of dry substances (10.47 ± 0.02). The TLC method (medium No. 13) revealed the content of quercetin and quercetin-3,7-O- β -D-glucopyranosides in trisaccharide and disaccharide forms. The HPLC method detected rutin (73.07 ± 3.65 mg/kg), quercetin (15.08 ± 0.75 mg/kg), apigenin (23.63 ± 1.18 mg/kg), and coleofolide (12.53 ± 0.63 mg / kg). The resulting nutrient medium made it possible to obtain enough callus *Orchis maculata* L. to extract biologically active substances for medicinal purposes.

Keywords: *Orchis maculata* L., salep, *in vitro* biotechnology, callus, phytohormones, biologically active substances, alkaloids, flavonoids, carotenoids, anthocyanins, sterols.

References

1. Gantait S., Das A., Mitra M., Chen J.T. Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology. *South African Journal of Botany*, 2021, vol. 139. pp. 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.015>.
2. Henneresse T., Tyteca D. Insect Visitors and Potential Pollinators of *Orchis militaris* (Orchidaceae) in Southern Belgium. *Journal of insect science (Online)*, 2016, vol. 16(1), p. 104. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew088>.
3. Nuerxiati R., Abuduwaili A., Mutailifu P., Wubuliksimu A., Rustamova N., Jingxue C., Aisa H. A., Yili A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 141, pp. 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.112>.
4. Salmanova R.K. The use of Orchids of the flora of the Nakhchivan Autonomous Republic in folk medicine. *Bulletin of Contemporary Research*, 2018, no. 10.3(25), pp. 86–87. (in Russ.)
5. Tekinşen K.K., Güner A. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry*, 2010, vol. 121, iss. 2, pp. 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.066>.
6. Hossain M. M., Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances – An overview. *Fitoterapia*, 2011, vol. 82, iss. 2, pp. 102–140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>.
7. Kovrigina L. N., Filippova A. V., Romanova N. G., Mongush B. O. Protected orchids in the Kemerovo district. *Bulletin of the Kemerovo State University. Series: Biological, technical and earth sciences*, 2017, no. 4, pp. 4–8. (in Russ.) DOI: 10.21603/2542-2448-2017-4-4-8.
8. Popova E., Kim H.H., Saxena P.K., Florent Engelmann, Hugh W. Pritchard, Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology Advances*, 2016, vol. 34, iss. 4, pp. 380–403. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.001>.

9. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals. *Ontogenesis*, 2018, T.49, № 5, P. 273–288. (in Russ.) DOI: 10.1134/S0475145018050038.
10. M. Gvasaliya, V. Malyarovskaya, R. Rakhmangulov Growth regulators influence on the induction of tea plants (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze) callus genesis *in vitro*. *Bulletin of Michurinsk State Agrarian University*, 2020, no. 2(61), pp. 51–56. (in Russ.)
11. Molchan O.V., Yurin V.M. Effects of phytohormones on callus initiation and growth characteristics of callus and suspension cultures of *Vinca major* L. *Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular foundations of the functioning of biosystems*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 162–169. (in Russ.)
12. Sheyko E.A. Orchids Rare of Temperate Zone and Modern Methods of Their Effective Preservation in Artificial Conditions, 2013, no. 4. (in Russ.) URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-3>
13. Murashige T., Scoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiology Plantarum*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.
14. Yeow L.C., Chew B.L., Sreeramanan S. Elevation of secondary metabolites production through light-emitting diodes (LEDs) illumination in protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium* hybrid orchid rich in phytochemicals with therapeutic effects. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 27, p. e00497. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00497>.
15. Lee P.L., Chen J.T. Plant regeneration via callus culture and subsequent *in vitro* flowering of *Dendrobium huoshanense*. *Acta Physiol Plant*, 2014, vol. 36, pp. 2619–2625. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1632-7>.
16. Bhattacharyya P., Kumaria S., Diengdoh R., Tandon P. Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene*, 2014, vol. 2, pp. 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.06.003>.
17. Filippava S.N., Ditchenko T.I., Lohvina H.O., Yurin V.M. Development of an effective method for deposition of callus cultures of valuable medicinal plants. *Proceedings of BSU*, 2015, vol. 10, no. 1, pp. 205–220. (in Russ.)
18. Sukhikh S., Noskova S., Ivanova S., Skrypnik L., Pungin A., Ulrikh E., Chupakhin E., Babich O. Study of the Properties of *In Vitro* *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Family Orchidaceae). *Extracts. Plants (Basel, Switzerland)*, 2021, vol. 10(7), p. 1330. <https://doi.org/10.3390/plants10071330>.

Anna I. Loseva, Candidate of Technical Sciences, Head of the Department of Scientific and Publishing Activities, Kemerovo State University, Kemerovo, losevaa@mail.ru

Anna V. Podznyakova, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo State University, Kemerovo.

Alexander Yu. Prosekov, Doctor of Technical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Academy of Sciences, Head of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo State University, Kemerovo, aprosekov@rambler.ru.

Elena V. Ostapova, Doctor of Chemical Sciences; Professor; Professor of the Department of Fundamental and Applied Chemistry, Kemerovo State University, Kemerovo.

Olga G. Altshuler, Doctor of Chemical Sciences; Associate Professor, Professor of the Department of General and Experimental Physics, Kemerovo State University, Kemerovo.

Received August 23, 2021

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Биотехнология выращивания каллусных культур ятрышника шлемовидного – перспективного источника биоактивных веществ / А.И. Loseva, А.В. Подзнякава, А.Ю. Просеков и др. // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2021. – Т. 9, № 4. – С. 13–22. DOI: 10.14529/food210402

FOR CITATION

Loseva A.I., Podznyakova A.V., Prosekov A.Yu., Ostapova E.V., Altshuler O.G. Callus *Orchis maculata* L. as a Source of Bioactive Substances: Biotechnology of Cultivation. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2021, vol. 9, no. 4, pp. 13–22. (in Russ.) DOI: 10.14529/food210402