

УДК 57.086.835

## Получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol.

© 2020 М.Т. ХАНДЫ<sup>1,2\*</sup>, Д.В. КОЧКИН<sup>3,4</sup>, С.В. ТОМИЛОВА<sup>3,4</sup>, Б.А. ГАЛИШЕВ<sup>5</sup>, А.Г. КЛЮШИН<sup>4</sup>, А.М. НОСОВ<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, 677000

<sup>2</sup> ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, Владивосток, 690022

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва, 119234

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева», Москва, 127276

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, 620002

\*e-mail: handy\_89@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2020 г.

После доработки 05.07.2020 г.

Принята к публикации 19.09.2020 г.

Из асептических проростков вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus*) — продуцента кумаринов, получены каллусные и суспензионные культуры клеток. Каллусные культуры клеток *P. sibiricus* характеризовались бело-желтым цветом, сочетанием рыхлых и плотных скоплений клеток и удовлетворительным ростом: индекс роста по сухой биомассе для культуры листового происхождения составлял 7–9, гипокотильного — 10–12 и корневого происхождения — 11–13. Из каллусных культур листового и гипокотильного происхождения были инициированы суспензионные культуры клеток, которые тоже имели бело-желтый цвет и состояли преимущественно из агрегатов клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типа, причем степень агрегированности была различной для культур разного происхождения. Жизнеспособность клеток в течение цикла выращивания находилась на уровне 70–80%. В отличие от исходных каллусных культур, наиболее высокими показателями роста (индекс роста около 10) характеризовалась линия суспензионной культуры клеток, полученная из каллусов листового происхождения. Предварительный фитохимический скрининг методом УЭЖХ ЭР МС показал присутствие кумаринов группы келлактона в биомассе первичных (1–3-й цикл выращивания) каллусных и полученных из них суспензионных культурах клеток вздутоплодника сибирского.

**Ключевые слова:** вздутоплодник сибирский, *Phlojodicarpus sibiricus*, каллусогенез, суспензионная культура клеток, кумарины

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-54-61

Клетки *in vitro* являются экспериментально созданной популяцией дедифференцированных соматических клеток. При определенных условиях культура клеток высших растений может быть

источником для получения экологически чистого возобновляемого растительного сырья с высоким содержанием целевых биологически активных веществ независимо от климатических и погодных

Список сокращений: 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП — 6-бензиламинопурин; УЭЖХ ЭР МС — ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением; I — индекс роста; MS — питательная среда Мурашиге и Скуга.

условий [1]. Данная технология оправдывает себя при получении культур клеток редких и исчезающих лекарственных растений с уникальными химическими соединениями. К числу таких растений можно отнести вздутоплодник сибирский *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. (семейство Зонтичные (Umbelliferae)), который занесен в Красную книгу Республики Саха (Якутия), Амурской области и Забайкальского края [2–4].

Известно, что *P. sibiricus* используют при атеросклерозе, болезни Рейно, облитерирующем эндартериите, хронической коронарной недостаточности, а также при заболеваниях легких, желудка и центральной нервной системы [5–10]. Биологическая активность *P. sibiricus* обусловлена высоким содержанием пиранокумаринов виснадина и дигидросамидина в корнях и в корневище (не менее 3%). На основе суммы кумаринов *P. sibiricus* выпускались лекарственные средства сосудорасширяющего действия «Дидимин» и «Фловерин», а также комплексный препарат «Сафинор», применяемый для улучшения работы сердечной мышцы при истощающих заболеваниях и тяжелой нагрузке. В настоящее время производство названных препаратов приостановлено из-за отсутствия сырья [11–12].

Согласно анализу доступной литературы, культуры клеток *P. sibiricus* и растений рода *Phlojodicarpus* spp. ранее получены не были. Однако есть немало успешных примеров получения культур клеток растений-продуцентов кумаринов. Было исследовано влияние элиситоров на синтез кумаринов в культурах клеток *Ammi majus* L. и *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. Культура клеток *Thamnosma montana* Torr. & Frém. была использована при исследовании путей синтеза фуранокумаринов [13–16].

Таким образом, целью настоящей работы стало получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток *Phlojodicarpus sibiricus* для изучения возможности получения с их помощью растительного сырья для производства лекарственных препаратов при сохранении растений, занесенных в Красную книгу.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве эксплантов были использованы семядольные листья, гипокотили и корни асептических проростков вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol.), полученных из семян южно-якутской популяции. Семена в течение 10 мин стерилизовали раствором натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты (0,5% активного хлора) («Жавельон/

НовелтиХлор», Франция) и трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. После стерилизации семена высевали на безгормональную агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (MS), приготовленную по стандартной прописи [17] с добавлением инозитола (0,1 г/л) (Merck, Германия) и сахарозы (30 г/л) (Merck.). Проращивание осуществляли при  $25 \pm 1$  °C и фотопериоде 16/8 ч. В дальнейшем семядольные листья, гипокотили и корни полученных проростков *in vitro* использовали для индукции каллусных культур клеток.

Суспензионные культуры клеток получали из 4-недельных каллусных культур гипокотильного и листового происхождения после 3 цикла выращивания. Около 30 г каллусных клеток (по сырой биомассе) помещали в колбы с жидкой питательной средой (MS с 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП) на круговую качалку (100 об./мин). Через 28 сут культивирования первичные суспензионные культуры пересаживали разбавляя инокулят свежей средой в 4 раза. Впоследствии оптимальный режим выращивания составлял 21 день со степенью разведения инокулят: свежая среда — 1:4 (для суспензионной культуры клеток гипокотильного происхождения) и 1 : 10 (для суспензионной культуры клеток листового происхождения).

## Культивирование каллусных и суспензионных культур

Культивирование каллусных и суспензионных культур клеток проводили в темноте при  $25 \pm 1$  °C. Каллусные культуры выращивали на чашках Петри (d = 90 мм), цикл субкультивирования составлял 35 сут, при пересеве каллус делили на 4–6 частей. Культивирование суспензионных культур проводили в колбах объемом 250 мл (35–40 мл суспензии в колбе) на качалке (100 об./мин), цикл субкультивирования — 21 сут, для пересева использовали соотношение инокулят : свежая среда равное 1:4 (для суспензионной культуры клеток гипокотильного происхождения) и 1:10 (для суспензионной культуры клеток листового происхождения).

## Показатели каллусных и суспензионных культур

Для характеристики каллусных и суспензионных культур использовали индекс роста (*I*) по накоплению сырой и сухой биомассы в цикле культивирования, который рассчитывали по формуле:

$I = X_{\max}/X_0$ , где  $X_{\max}$  и  $X_0$  — максимальное и начальное значения критерия роста соответственно (сухая и сырая масса клеток) [18].

Для определения сырой и сухой биомассы каллусных культур использовали отделенные

от среды каллусы, для суспензионных культур — фиксированный объем суспензии (не менее 10 мл) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера. Биомассу в обоих случаях высушивали в сушильном шкафу при 50 °С в течение 24 ч [18].

Для характеристики физиологического состояния суспензионных культур дополнительно определяли жизнеспособность клеток, используя прижизненный краситель феносафранин (0,1%-ный раствор) (Merck). Проводили подсчет живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Жизнеспособность культуры выражали как процент живых культивируемых единиц к общему числу просчитанных агрегатов (не менее 200) [18].

Микрофотографии суспензионных культур клеток сделаны с помощью цифровой камеры TourCam SCMOS 0,3 Мпикс (Китай).

### Фитохимический скрининг вторичных метаболитов

Для качественного фитохимического анализа вторичных метаболитов в биомассе каллусных и суспензионных культур клеток *P. sibiricus* использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ ЭР МС). В качестве образца сравнения использовали корни интактных растений *P. sibiricus* (сбор 2017 года, Олекминский район Республики Саха (Якутия), Россия).

**Подготовка проб для УЭЖХ ЭР МС анализа.** Навеску измельченного воздушно-сухого растительного материала (40–100 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70%-ным этиловым спиртом в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 4 140 g в течение 10 мин (Микроцентрифуга МЦФ, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 45 °С). Полученный сухой остаток суспендировали в 1 мл 5%-ной уксусной кислоте и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл 5%-ной уксусной кислотой, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 45 °С. Перед анализом сухой остаток растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1, по объему). Объем вводимой пробы — 1–2 мкл.

УЭЖХ ЭР МС проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным

масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters). Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (диапазон  $m/z$  100 — 2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации — 120 °С, температура десольвации — 250 °С, напряжение на капилляре — 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы — 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/ч.

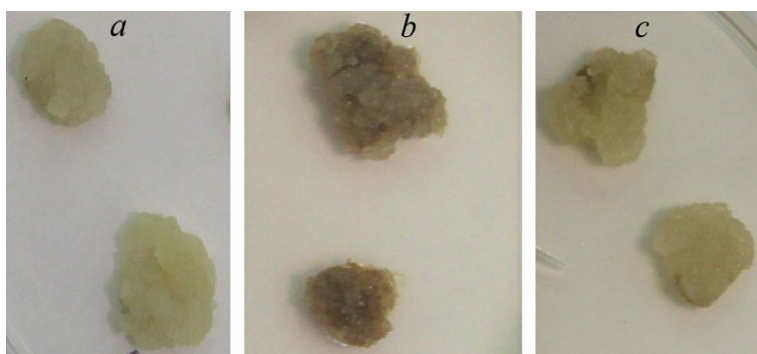
Условия хроматографического разделения: колонка ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, Ирландия), температура колонки — 40 °С, скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин. Компоненты подвижной фазы: 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). В работе использовали градиентный режим элюирования. В ходе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, % по объему): 0–1 мин. — 15%, 1–5 мин. — 15→30%, 5–15 мин. — 30→38%, 15–15,5 мин. — 38→45%, 15,5–23 мин. — 45%, 23–23,5 мин. — 45→95%. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было показано, что первичный каллусогенез на механически поврежденных частях семядольных листьев, гипокотилей и корней происходил на питательной среде MS с 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП на 12 сутки культивирования. Интенсивность каллусогенеза составляла для семядольных листьев — 70%, для гипокотилей — 33%, для корней — 65%.

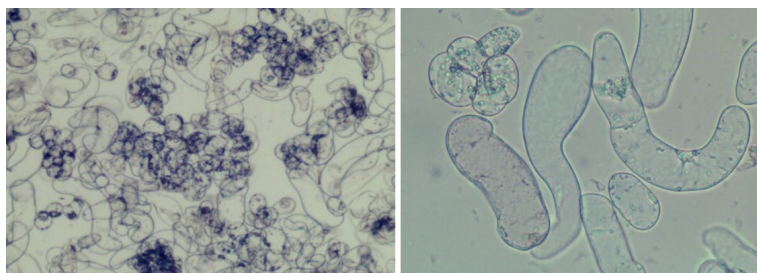
Полученные каллусные культуры клеток *P. sibiricus* были преимущественно бело-желтого цвета с сочетанием как рыхлых, так и плотных скоплений клеток, в процессе культивирования наблюдалось появление коричневых участков каллусной ткани. Данные культуры клеток сохраняли высокий ростовой потенциал в течение более чем 20 циклов культивирования, индекс роста по сухой биомассе для культуры листового происхождения составлял 7–9, гипокотильного происхождения — 10–12 и корневого происхождения — 11–13 (рис. 1).

Из каллусов гипокотильного и листового происхождения были получены суспензионные культуры клеток, которые характеризовались бело-желтым цветом, содержали агрегаты клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типа и одиночные меристемоподобные, паренхимоподобные, удлинённые и аномальные клетки. При этом суспензионная культура клеток из каллусов листового происхождения



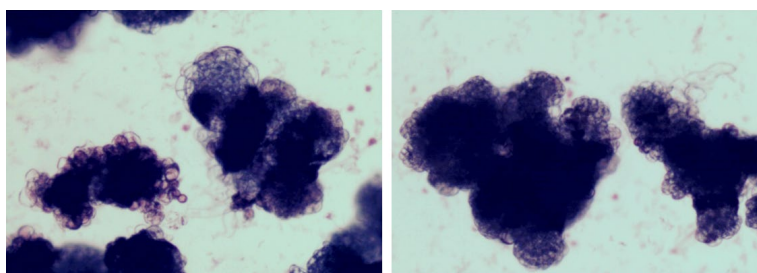
**Рис. 1.** Каллусные культуры клеток *P. sibiricus*: *a* — листового происхождения; *b* — гипокотильного происхождения; *c* — корневого происхождения

**Fig. 1.** Callus cell cultures of *P. sibiricus*: *a* — leaf origin; *b* — hypocotyl origin; *c* — root origin



**Рис. 2.** Микрофотографии суспензионной культуры клеток *P. sibiricus*, полученной из каллуса листового происхождения (увеличение — 360х, 890х)

**Fig. 2.** Micrographs of *P. sibiricus* suspension cell culture obtained from callus of leaf origin (magnification — 360x, 890x)



**Рис. 3.** Микрофотографии суспензионной культуры клеток *P. sibiricus*, полученной из каллуса гипокотильного происхождения (увеличение — 360х)

**Fig. 3.** Micrographs of *P. sibiricus* suspension cell culture obtained from callus of hypocotyl origin (magnification — 360x)

имела преимущественно более мелкие агрегаты, которые включали от 10 до 30 меристемоподобных клеток, и большое количество одиночных меристемоподобных, паренхимоподобных, удлинённых и аномальных клеток. Для суспензионной культуры из каллусов гипокотильного происхождения показано наличие большого количества крупных плотных агрегатов, состоящих как минимум из 30–50 клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типа. Жизнеспособность клеток полученных суспензионных культур в течение цикла выращивания находилась на уровне 70–80% (рис. 2, 3).

Суспензионную культуру клеток *P. sibiricus* листового происхождения можно считать хорошо растущей, так как индекс роста (*I*) по сухой биомассе составлял около 10. В свою очередь, суспензионная культура гипокотильного происхождения имела более низкие показатели роста (*I* по сухой биомассе около 4).

Питательная среда MS достаточно часто используется для получения различных растительных культур клеток, так как считается наиболее сбалансированной и универсальной. Ее применение было успешным в случае с каллусной культурой клеток руты душистой (*Ruta*

*graveolens* L.), где в качестве основных фитогормонов использовали 2,4-Д и БАП [19]. В работах с растениями-продуцентами кумаринов применяли также среды Гамборга (B<sub>5</sub>), Уайта и Линсмайера-Скуга (LS), но так как в большинстве случаев эти исследования единичные и проводились на разных родах растений, то подбор оптимального варианта культивирования остается индивидуальным [13, 16, 20].

На следующем этапе работы с помощью УЭЖХ ЭР МС был проведен первичный фитохимический скрининг вторичных метаболитов в биомассе некоторых из полученных культур клеток (рис. 4, табл. 1).

В результате проведенного фитохимического анализа эфиры келлактона удалось обнаружить только в биомассе первичных (сразу после инициирования) каллусной и суспензионной культурах клеток *P. sibiricus* гипокотильного происхождения. Структурная идентификация обнаруженных соединений была выполнена на основании сопоставления их хроматографического и масс-спектрометрического поведения с данными литературы (табл. 1) [20], а также сравнения с эфирами келлактона, обнаруженными в экстракте из корней интактного растения *P.*

**Результаты УЭЖХ ЭР МС анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы каллусной культуры клеток *P. sibiricus* гипокотильного происхождения**

**Results UPLC ESI MS analysis (positive-ion mode) of an extract from a biomass of *P. sibiricus* callus cell culture of hypocotyl origin**

Номер пика*	$t_R$ , мин**	Масс-спектры, $m/z$ **		Результаты идентификации
		[M+Na] <sup>+</sup>	Другие ионы	
II	13,1	411,1459 C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> Na (9.5 ppm)	427.12 [M+K] <sup>+</sup> 406.20 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 351.20 [M+Na-60] <sup>+</sup> 329.14 [M+H-60] <sup>+</sup> 245.09 [M+H-60-84] <sup>+</sup> 227.07 [M+H-60-84-18] <sup>+</sup>	виснадин
III	13,5	411,1448 C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> Na (6.8 ppm)	427.12 [M+K] <sup>+</sup> 406.18 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 329.14 [M+H-60] <sup>+</sup> 245.09 [M+H-60-84] <sup>+</sup> 227.07 [M+H-60-84-18] <sup>+</sup>	дигидросамидин
V	18.6	451.1753 C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> Na (4.4 ppm)	879.35 [2M+Na] <sup>+</sup> 446.22 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 329.14 [M+H-100] <sup>+</sup> 245.09 [M+H-100-84] <sup>+</sup> 227.07 [M+H-100-84-18] <sup>+</sup>	келлактона эфир (ацильные остатки: 3-изовалероил / 2-метилбутироил-4-сенециоил / ангелоил)
VI	19.2	453.1913 C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub> Na (5.3 ppm)	883.43 [2M+Na] <sup>+</sup> 448.24 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 329.14 [M+H-102] <sup>+</sup> 245.08 [M+H-102-84] <sup>+</sup> 227.07 [M+H-102-84-18] <sup>+</sup>	келлактона эфир (ацильные остатки: 3,4-диизовалероил / 2-метилбутироил / изовалероил-2-метилбутироил)

*Примечание:* \* — нумерация пиков соответствует таковой на рис. 4;  $t_R$  — время удерживания на хроматографической колонке, \*\* — данные масс-спектров (указаны: значения  $m/z$  для обнаруженных ионов, элементный состав и ошибка определения массы иона [M+Na]<sup>+</sup> (указана в скобках в ppm)).

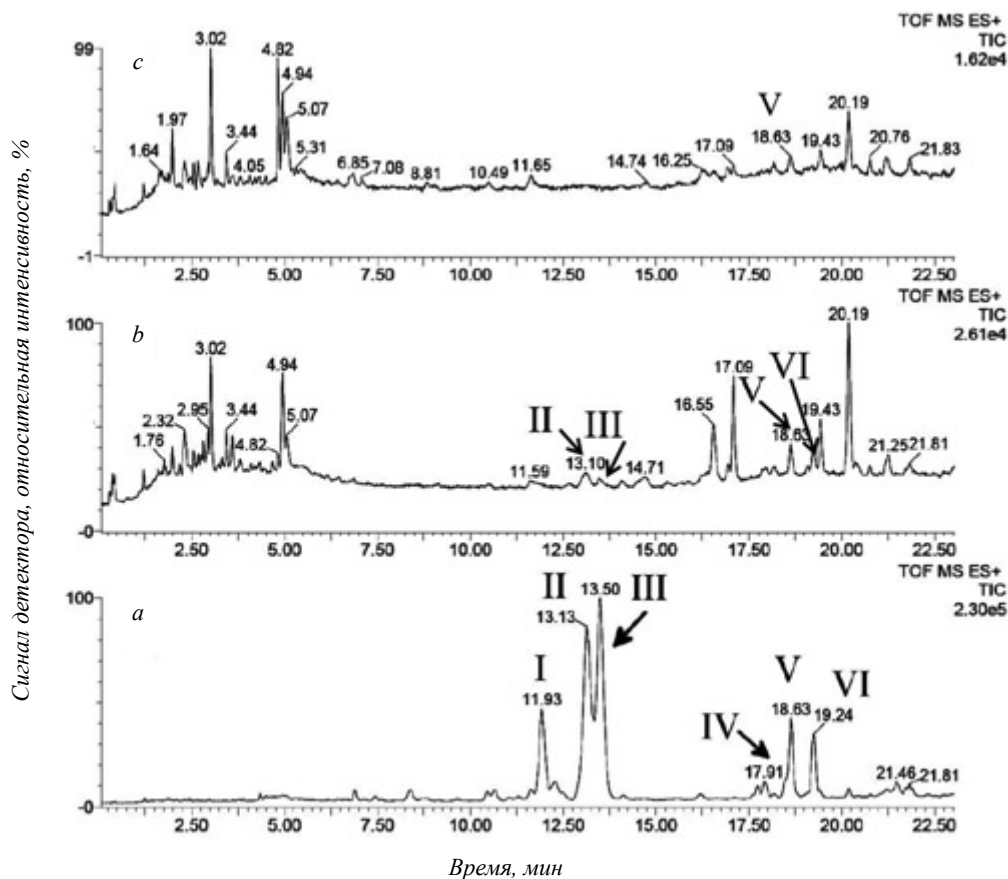
Note: \* — peak numbering corresponds to that in fig. 4;  $t_R$  — retention time on a chromatographic column, min; \*\* — mass spectral data (indicated:  $m/z$  for the detected ions, elementary composition and mass determination error of the [M+Na]<sup>+</sup> ion (indicated in brackets in ppm))

*sibiricus* (рис. 4). Интенсивность сигналов хроматографических пиков (на хроматограммах экстрактов из биомассы каллусной и суспензионной культур клеток), соответствующих эфирам келлактона, достаточно низкая. Этот факт позволяет предположить, что кумарины производные келлактона присутствуют в биомассе культур клеток *P. sibiricus* в следовых количествах.

В литературе имеются сведения об образовании различных кумаринов в культурах клеток высших растений. Однако большинство работ этого направления посвящено изучению закономерностей накопления в клетках растений *in vitro* достаточно распространенных групп кумаринов — линейных фуранокумаринов (таких как псорален, бергаптен, ксантотоксин и др.) и/или их предшественников «простых» гидроксильных/метоксилированных кумаринов (например, умбеллиферона). Сведений об образовании в культурах клеток растений редкой группы ангулярных пиранокумаринов,

к которой относятся идентифицированные в настоящей работе производные келлактона, в доступной литературе обнаружить не удалось [13–16, 19–20]. На основании этого, представленные результаты можно рассматривать как одно из первых сообщений об образовании в культивируемых *in vitro* клетках растений (в данном случае, в первичных каллусных культурах *P. sibiricus*) уникальных ангулярных пиранокумаринов.

Таким образом, впервые получены каллусные и суспензионные культуры клеток вздутоплодника сибирского, имеющие удовлетворительные ростовые характеристики. Показано наличие в первичных каллусных и суспензионных культурах клеток *P. sibiricus* эфиров келлактона — представителей редкой группы ангулярных пиранокумаринов. Однако для выяснения закономерностей накопления этих соединений в полученных культурах клеток вздутоплодника, безусловно, требуются дополнительные исследования.



**Рис. 4.** УЭЖХ ЭР МС хроматограммы (режим полного ионного тока, регистрация положительных ионов) спиртовых экстрактов из корней интактного растения и биомассы каллусных и суспензионных культур клеток *P. sibiricus*: *a* — корни; *b* — каллусная культура клеток гипокотильного происхождения; *c* — первичная суспензионная культура клеток гипокотильного происхождения; I — VI — пики идентифицированных эфиров келлактона: I — птериксин; II — виснадин; III — дигидросамидин; IV — келлактона эфир (ацильные остатки: 3-изовалероил / 2-метилбутироил-4-изобутироил); V — келлактона эфир (ацильные остатки: 3-изовалероил / 2-метилбутироил-4-сенециоил / ангелоил); VI — келлактона эфир (ацильные остатки: 3,4-диизовалероил / 2-метилбутироил эфир / изовалероил-2-метилбутироил).

**Fig. 4.** UPLC ESI MS chromatograms (the total ion current chromatograms in positive-ion mode) of ethanolic extracts from the roots of intact plant and biomass of *P. sibiricus* callus and suspension cell cultures: *a* — roots; *b* — callus cell culture of hypocotyl origin; *c* — primary suspension cell culture of hypocotyl origin; I — VI — peaks of identified kellactone esters: I — pteryxin; II — visnadin; III — dihydrosamidin; IV — khellactone 3-isovaleroyl/2-methylbutyroyl-4-isobutyroyl ester; V — khellactone 3-isovaleroyl/2-methylbutyroyl-4-seneciroyl/angeloyl ester; VI — khellactone 3,4-diisovaleroyl/2-methylbutyroyl ester/khellactone isovaleroyl-2-methylbutyroyl ester.

Работы по получению и выращиванию культур клеток *P. sibiricus* и исследованию их ростовых характеристик выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00097).

Работы по анализу фитохимических характеристик культур клеток *P. sibiricus* выполнены при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019).

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Носов А.М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*, 1999, 46(6), 837–844..

2. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов.

3. Красная книга Амурской области [Электронный ресурс]: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов [Главный редактор А.В. Сенчик, научный редактор Е.И. Маликова. [2-е изд.]. Благовещенск, Россия: Издательство ДальГАУ, 2019, 504

4. Красная книга Забайкальского края: Растения [Научный редактор О.А. Попова]. Новосибирск, Россия: Дом мира, 2017, 384.

5. Гуляев С.М., Тараскин В.В., Урбанова Е.З. Адаптивный эффект экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* при ишемии головного мозга. *Обзоры по клинической*



- фармакологии и лекарственной терапии, 2019, 17(2), 63–66. doi: 10.7816/RCF17263-66
6. Гуляев С.М., Тараскин В.В., Раднаева Л.Д., Николаев С.М. Антиамнестический эффект экстракта вздутоплодника сибирского при скополамин-индуцированной амнезии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2017, 15(4), 53–57. doi: 10.17816/RCF15453-57
  7. Урбанова Е.З., Гуляев С.М., Николаев С.М., Туртуева Т.А. Нейрофармакологические эффекты *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. *Вестник Бурятского государственного университета*, 2013, 12, 125–128.
  8. Гуляев С.М., Николаев С.М., Урбанова Е.З., и др. Влияние настойки *Phlojodicarpus sibiricus* на когнитивные функции крыс с церебральной ишемией. *Вестник Бурятского государственного университета*, 2012, 12, 103–106.
  9. Гуляев С.М. Защитное действие *Phlojodicarpus sibiricus* при ишемии головного мозга у крыс. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2009, (3), 172–174.
  10. Гуляев С.М. Противотревожное действие *Phlojodicarpus sibiricus*. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2009, (3), 175–177.
  11. Hoult J.R.S., Paiva M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, 1996, 27(4), 713–722. doi: 10.1016/0306-3623(95)02112-4
  12. Васильева О.Д. Вздутоплодник сибирский *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. в Якутии (Биология, интродукция, охрана): автореф. дис. канд. биол. наук. Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, 2005
  13. Steck W., Bailey B.K., Shyluk J.P., Gamborg O.L. Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 1971, 10(1), 191–194. doi:10.1016/S0031-9422(00)90269-3
  14. Hamerski D., Schmitt D., Matern U. Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 1990, 29(4), 1131–1135. doi: 10.1016/0031-9422(90)85417-E
  15. Thieme G., Stuttgart V. Coumarins and Other Phenylpropanoid Compounds in the Defense Response of Plant Cells. *Planta Med.*, 1991, 57, 15–20. doi: 10.1055/s-2006-960224
  16. Kutney J.P., Salisbury P.J., Verma A.K. Biosynthetic studies in the coumarin series -Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
  17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
  18. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. В кн.: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений [Ред. Вл.В. Кузнецов, В.В. Кузнецов, Г.А. Романов]. Москва, Россия: БИНОМ, 2012, 386–403.
  19. Бурая Н.С., Фоменко Т.И. Регуляция роста и развития культуры *in vitro* руты душистой (*Ruta graveolens* L.) — источника биологически активных соединений. *Труды БГУ*, 2010, 5(2). url: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/16327>
  20. Ekiert H., Gomółka E. Coumarin compounds in *Ammi majus* L. callus cultures. *Die Pharmazie*, 2000, 55(9), 684–687.
  21. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., et al. Khellactone Derivatives and Other Phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin. *Molecules*, 2019, 24(12), 2286. doi: 10.3390/molecules24122286

## Obtainment and Phytochemical Screening of Callus and Suspension Cell Cultures of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol.

M.T. KHANDY<sup>1,2\*</sup>, D. V. KOCHKIN<sup>3,4</sup>, S.V. TOMILOVA<sup>3,4</sup>, B.A. GALISHEV<sup>5</sup>, A.G. KLYUSHIN<sup>4</sup> and A.M. NOSOV<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> M.K. Ammosov Yakutsk State University, Yakutsk, 677000, Russia

<sup>2</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Russian Academy of Sciences, Far East Branch, Vladivostok, 690022, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234, Russia

<sup>4</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia

<sup>5</sup> Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620002, Russia

\*e-mail: handy\_89@mail.ru

Received: April 26, 2020

Revised July 5, 2020

Accepted September 19, 2020

**Abstract**—Callus and suspension cell cultures have been obtained from aseptic seedlings of Siberian bloat fruit (*Phlojodicarpus sibiricus*), a producer of coumarins. *P. sibiricus* callus cultures were characterized by white-yellow coloration, a combination of loose and dense cell aggregates, and satisfactory growth. The dry biomass growth index for cultures of leaf, hypocotyle or root origin was 7–9, 10–12 and 11–13, respectively. Suspension cell cultures were initiated from calluses of leaf and hypocotyle origin; these cultures were also white-yellow and consisted mainly of cell aggregates of the meristem-like and parenchyma-like types with different aggregation degrees depending on the origin. Cell viability during the growth cycle was at the level of 70–80%. In contrast to the original callus cultures, the suspension culture of leaf callus origin had the highest growth characteristics (growth index of about 10). Preliminary phytochemical screening by UPLC ESI MS showed the presence of khellactone-group coumarins in the biomass of *P. sibiricus* primary calluses (1<sup>st</sup>–3<sup>rd</sup> growth cycle) and suspension cultures derived from them.

**Key words:** Siberian bloat fruit, *Phlojodicarpus sibiricus*, callusogenesis, suspension cell culture, coumarins

**Funding**—The works on obtaining and growing *P. sibiricus* cells, as well as studying their growth characteristics were financed by the Russian Scientific Foundation grant no. 74-00097.

The study of phytochemical characteristics of *P. sibiricus* cell cultures was supported by the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia (FSRG-2020-0019).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-54-61