

УДК 581.143.6

Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse — продуцентов изофлавоноидов

© 2020 М.В. ТИТОВА^{1*}, Д.В. КОЧКИН^{1,2}, Г.И. СОБОЛЬКОВА¹, А.А. ФОМЕНКОВ¹, Р.А. СИДОРОВ¹, А.М. НОСОВ^{1,2}

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276

² Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

*e-mail: titomirez@mail.ru

Поступила в печать 08.06.2020 г.

После доработки 24.07.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Исследовали физиологические характеристики каллусных культур клеток верблюжьей колючки *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse — представителя семейства Бобовых, широко используемого в народной медицине. Показано, что при инициации каллусогенеза важным фактором являлся источник экспланта — более интенсивный каллусогенез наблюдали для эксплантов из различных органов стерильных проростков (около 100%), а не интактных растений (менее 30%) *A. persarum*. В результате получено более 20 линий каллусных культур клеток, отличающихся по морфологии, и для пяти наиболее интенсивно растущих линий определены ростовые показатели. Для наиболее стабильной по физиологическим показателям каллусной линии Ар-207 проведен анализ состава жирных кислот (ЖК) суммарных липидов и вторичных метаболитов. При помощи капиллярной газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) идентифицировано 19 индивидуальных С12–С24 ЖК, основную долю которых составляли пальмитиновая (~23%), стеариновая (~22%), линолевая (~14%) и α -линоленовая (~33%) кислоты. Установленное нетипичное соотношение ЖК (одновременное высокое содержание как насыщенных ЖК, так и полиненасыщенной α -линоленовой кислоты), возможно, обусловлено адаптацией клеток к условиям выращивания *in vitro*. Фитохимический анализ образуемых вторичных метаболитов проведен с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ МС). Установлено наличие соединений, относящихся к различным структурным группам изофлавонов. Обнаружены агликоны (каликозин, формонетин, изомер афрормозина), глюкозиды (глюкозид формонетина), а также эфиры глюкозидов (малонилглюкозиды каликозина, формонетина, изомера афрормозина, глицистеина и генистеина). Эти вторичные метаболиты широко распространены среди растений семейства *Fabaceae*, однако у представителей рода *Alhagi* изофлавоны встречаются редко. Присутствие малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi* spp. показано впервые.

Ключевые слова: эндемичные виды растений, *Alhagi*, культура клеток *in vitro*, каллусная культура клеток, изофлавоны, жирные кислоты

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-35-48

Различные виды верблюжьей колючки традиционно используют в восточной народной медицине в качестве лекарственных средств для

лечения ревматизма, бронхита, астмы, гастроэнтерита и язвы, заболеваний печени, мочевыводящих путей и желчного пузыря [1–8]. Недавно

Список сокращений: БАП — 6-бензиламинопурин; ГЖХ-МС — капиллярная газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ЖК — жирные кислоты; ИН — индекс ненасыщенности; МЭЖК — метиловые эфиры жирных кислот; НУК — α -нафтилуксусная кислота; ОДО и ЛДО — олеил- и линолеилдесатузные отношения соответственно; УЭЖХ МС — ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением; В5 — среда Гамборга; MS — среда Мурасиге-Скуга.

в *in vivo* и *in vitro* исследованиях биологической активности растений рода *Alhagi* выявлено их антибактериальное, противогрибковое, антиоксидантное, антипролиферативное и спазмолитическое действие, показано применение экстрактов *Alhagi* spp. как косметических ингредиентов при лечении гиперпигментация кожи [1, 6, 9–14]. Растения *Alhagi* spp. представляют особый интерес как потенциальный компонент функциональных продуктов питания и кормов благодаря присутствию большого количества легко перевариваемого белка вместе с различными другими эссенциальными питательными элементами и минералами [15–17].

Из разных органов растений *Alhagi* spp. выделены и идентифицированы вторичные метаболиты, относящиеся к различным классам природных соединений, а именно: фенольные соединения (фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, проантоцианидины, ксантоны, кумарины, гидролизующие танины, дифениловые эфиры и нафтохиноны), алкалоиды (арилэтиламины, производные пиррола, изохинолиновые алкалоиды), тритерпеновые соединения, сахара, витамины С, группы В и некоторые другие [18, 19].

Известно, что культивируемые *in vitro* клетки высших растений обладают рядом преимуществ при использовании как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях в области физиологии и биохимии растений, цитологии, биоинженерии [20]. Культуры клеток высших растений в современной биотехнологии используют для получения штаммов-продуцентов, обладающих необходимым комплексом свойств (интенсивным ростом, высокой жизнеспособностью клеток, высокой продуктивностью по целевым биологически активным веществам). В то же время к настоящему времени появилось много работ, в которых показано, что вторичный метаболизм в клетках может существенно отличаться в системах *in vitro* и *in vivo* [21, 22]. Например, для культур клеток *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* характерно образование преимущественно фураностаноловых стероидных гликозидов, для культур клеток *Panax* spp. — присутствие малонильных производных гинзенозидов, тогда как в интактных растениях эти соединения обнаруживают в незначительных количествах [23–25].

Таким образом, исследование особенностей вторичного метаболизма в культурах клеток высших растений имеет как теоретическое, так и прикладное значение.

В открытом доступе сравнительно немного публикаций по получению и описанию культур клеток и тканей *Alhagi* spp. Определенная сложность

при анализе публикаций по культурам клеток верблюжьей колючки связана с полиморфизмом этого растения и, как следствие, с разночтениями в определении ее видовой принадлежности. В частности, на основании изучения многочисленных экземпляров растений показано, что Верблюжья колючка персидская, или Янтак персидский (*Alhagi persarum* Boiss. et Buhse), — очень вариабельный вид. Так, Awmack & Lock [26] приводят перечень встречающихся в различных публикациях синонимов этого растения: *Alhagi camelorum* Fisch., *Alhagi pseudalhagi* (M. Bieb.) Fisch., *Alhagi pseudalhagi* subsp. *persarum* (Boiss. & Buhse) Takht., *Hedysarum alhagi* L., *Hedysarum pseudalhagi* M. Bieb., *Alhagi maurorum* Medik. subsp. *maurorum*, *Alhagi camelorum* var. *spinis-elongatis* Boiss. По мнению авторов, эти разночтения обусловлены наблюдаемыми различиями по высоте, размеру плодов и характеру ветвления побегов в зависимости от почвы и климатических условий произрастания.

Первую культуру тканей *A. camelorum* с высокой регенеративной способностью получили в 1981 году Bharal & Rashid [27]. Позже был выполнен ряд работ по микрклональному размножению, получению каллусных культур клеток, культур «бородатых» корней и регенератов для других видов этого рода растений, в частности *A. graecorum* [28–31].

Практически нет публикаций по детальному изучению соединений вторичного метаболизма в разных объектах *Alhagi* spp. *in vitro* — в основном представлены данные по общему содержанию белков, фенольных соединений, липидов и аминокислот [31–33].

Результаты исследований биологической активности комплексных экстрактов и индивидуальных соединений растений *Alhagi* spp., а также отсутствие значимых природных запасов этих растений свидетельствуют о перспективности разработки биотехнологических подходов получения альтернативного растительного сырья для медицинских и косметических препаратов.

Целью работы было получение каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse и исследование физиологических и биохимических характеристик полученных линий для их дальнейшего применения в биотехнологии.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал

Для получения культур клеток использовали листья и побеги интактных растений, семена и стерильные проростки *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse. Растительный материал с определением

Таблица 1

Состав питательных сред для проращивания эксплантов и семян *A. persarum*

Composition of culture media for germination of *A. persarum* explants and seeds

Компонент среды	Содержание в 1 л среды, г			
	среда 1	среда 2	среда 3	среда 4
Сахароза	30	—	30	30
Глюкоза	—	20	—	—
Тиамин	—	$1 \cdot 10^{-3}$	—	$1 \cdot 10^{-3}$
Пиридоксин	—	$1 \cdot 10^{-3}$	—	$1 \cdot 10^{-3}$
Никотиновая кислота	—	—	—	$5 \cdot 10^{-3}$
Са-пантотенат	—	—	—	$1 \cdot 10^{-2}$

Примечание: в средах 1, 2, 4 минеральная основа по MS, в среде 3 — по B5. Все среды содержали 0,5 г/л гидролизата казеина, 0,1 г/л мезоинозита и 7,0 г/л агара.

Note: media 1, 2, 4 contained MS mineral base, medium 3 composed B5 mineral base. All media contained 0.5 g/L casein hydrolysate, 0.1 g/L inositol, 7.0 g/L agar.

Таблица 2

Состав питательных сред для каллусообразования

Composition of culture media for callus formation

Компонент среды	Содержание в 1 л среды, г					
	среда 5	среда 6	среда 7	среда 8	среда 9	среда 10
Сахароза	30	—	—	30	30	30
Глюкоза	—	20	20	—	—	—
НУК	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Кинетин	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	—	—	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
2,4-Д	—	—	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
БАП	—	—	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	—	—

Примечание: в средах 5, 6, 7, 10 минеральная основа по MS, в средах 8 и 9 — по B5. Все среды содержали 1 мг/л тиамина, 1 мг/л пиридоксина, 10 мг/л Са-пантотената, 0,5 г/л гидролизата казеина, 0,1 г/л мезоинозита, 7,0 г/л агара.

Note: media 5, 6, 7, 10 contained MS mineral base, media 8 and 9 composed B5 mineral base. All media contained 1 mg/L thiamine, 1 mg/L pyridoxine, 10 mg/L Ca-pantothenate, 0.5 g/L casein hydrolysate, 0.1 g/L inositol, 7.0 g/L agar.

его видовой принадлежности был любезно предоставлен Институтом биологии и лекарственных растений Академии наук Туркменистана (с 2019 года — Институт лекарственных растений Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Туркменистана).

Среды для культивирования клеток *in vitro*

В экспериментах использовали агаризованные среды с минеральной основой по Мурасиге-Скугу (MS) [34] или по Гамборгу (B5) [35]. Готовили несколько вариантов сред, различающихся по составу углеводов (сахароза или глюкоза), витаминов (тиамин, пиридоксин, Са-пантотенат (Sigma-Aldrich, США)) и регуляторов роста, в качестве которых использовали α -нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), кинетин и 6-бензиламинопурин (БАП) (Sigma-Aldrich).

Для интенсификации проращивания семян и развития проростков растений *A. persarum* использовали среды без добавления регуляторов роста, а для первичного каллусообразования — среды с регуляторами роста в различных комбинациях. Полный состав сред приведен в табл. 1 и 2.

Питательные среды автоклавировали в течение 15 мин подготовительного и 15 мин основного режима при добавочном давлении 0,7–0,8 атм.

Иницирование первичного каллусообразования

Для получения первичных каллусов из различных органов интактного растения побеги и листья промывали проточной водой, инкубировали в 3%-ном растворе KMnO₄: стебли в течение 5–10 мин, листья в течение 2 мин. Затем растительный материал помещали

на 20 с в 70%-ный этанол, обсушивали на фильтровальной бумаге и помещали в 0,1%-ный раствор сулемы: крупные стебли на 10 мин, тонкие стебли на 8 мин, листья на 2 мин, — после чего, обсушив на фильтровальной бумаге, промывали в стерильной дистиллированной воде (5 раз по 5 мин). Побеги и листья разрезали на экспланты размером 5×5 мм и помещали на агаризованные среды 5–10 в чашки Петри диаметром 4 и 6 см (рис. 1).

Для получения первичных каллусов из семян и затем стерильных проростков семена верблюжьей колючки промывали водой, помещали на 20 с в 70%-ный этанол и обсушивали на фильтровальной бумаге. Затем семена стерилизовали в 0,1%-ном растворе сулемы в течение 5 мин и промывали в стерильной дистиллированной воде порциями по 500 мл (5 раз по 5 мин). После стерилизации семена помещали на агаризованную среду 1, 2 или 3 (см. табл. 1) в чашки Петри диаметром 4 и 6 см, а также во флаконы, объемом 20 мл. Через 5–6 сут у части проросших семян в стерильных условиях отрезали гипокотиль, разрезали его на экспланты и помещали на гормональные среды для инициации каллусогенеза (среды 5–10).

Оставшуюся часть проросших семян пересаживали во флаконы на агаризованную среду 4 (см. табл.1) и инкубировали в климатической камере при температуре 25–26 °С в течение 2 сут в темноте, после чего переносили на постоянное освещение 130 мкм/(м²·с) белыми люминесцентными лампами. Через 8 сут у всех проросших семян появлялись первые листья, которые вместе со стеблем в стерильных условиях разрезали на экспланты и помещали на среды 5–10 в целях иницирования каллусообразования (рис. 1).

Интенсивность каллусогенеза, C (%), рассчитывали по формуле:

$$C = (N_i/N_0) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где N_i — число эксплантов на которых сформировался каллус, N_0 — общее число эксплантов.

Выращивание культур клеток растений

Цикл субкультивирования полученных каллусных культур клеток составлял в среднем 28–35 сут. Для выращивания всех исследуемых линий использовали чашки Петри (диаметр 60 мм). Каллус при пересеве делили на 3–7 частей массой 0,5–0,9 г (в зависимости от прироста). Культивирование проводили в климатических камерах на стеллажах в темноте, при 26 °С и влажности 60–70%.



Рис. 1. Получение эксплантов *A. persarum*: исходное интактное растение (а); экспланты побегов и листьев интактного растения в чашках Петри на питательных средах (b); семена (c) и проростки (d) верблюжьей колючки на питательных средах в чашках Петри и во флаконах.

Fig. 1. *A. persarum* explants: initial intact plant (a); explants of shoots and leaves of an intact plant in Petri dishes (b); seeds (c) and seedlings (d) of a camel thorn in Petri dishes and vials.

Используемые в работе колбы и инструменты стерилизовали в течение 60 мин при 180 °С в сухожаровом шкафу.

Определение ростовых характеристик культур клеток высших растений

Для характеристики роста каллусных культур клеток определяли вес сырой биомассы. Для определения начального веса культуры (вес транспланта) сначала взвешивали чашку Петри со средой. После помещения на среду транспланта проводили повторное взвешивание и определяли вес транспланта как разность второго и первого взвешивания. В конце цикла субкультивирования проводили взвешивание образовавшегося каллуса после отделения его от агаризованной среды.

По полученным результатам определяли прирост клеточной биомассы, I_i , за определенное время выращивания (на i -е сутки культивирования):

$$I_i = (X_i/X_0) \cdot 100\%, \quad (2)$$

где X_i — масса культуры на i -е сутки выращивания; X_0 — исходная масса культуры (масса трансплантата).

Анализ качественного и количественного состава жирных кислот в суммарных липидах клеток каллусных культур

При определении состава жирных кислот (ЖК) и их количества 200–400 мг сырой каллусной ткани гомогенизировали тefлоновым пестиком в 2-мл пробирках типа Eppendorf и добавляли используемую в качестве внутреннего стандарта маргариновую кислоту (Sigma-Aldrich) (25,2 нг в 100 мкл *изо*-пропанола) и 300 мкл 1 М КОН в 80%-ном водном этаноле. Пробирки энергично встряхивали на вортексе Biosan Microspin (BioSan, Латвия) и выдерживали 60 мин в разогретом до 75 °С твердотельном термостате Biosan, после чего добавляли 300 мкл *n*-гексана (ч. д. а.; «Химмед», Россия), энергично встряхивали и отбирали верхний слой, содержащий неомыляемые компоненты (свободные стеринны, фенольные соединения). К полученной суспензии добавляли 100 мкл 20%-ной серной кислоты до слабокислой реакции (рН 4.5–4.7 по индикаторной бумаге) и экстрагировали свободные ЖК 300 мкл *n*-гексана. Гексановый раствор переносили в 1,5-мл пробирки типа Eppendorf и высушивали в токе аргона до полного удаления растворителя из пробы, после чего к сухому остатку добавляли 150 мкл 1%-ного раствора серной кислоты в абсолютизированном метаноле и выдерживали пробирки 30 мин при 55 °С в твердотельном термостате. Полученные таким образом метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) экстрагировали 200 мкл *n*-гексана. Раствор МЭЖК переносили в 0,6-мл пробирки и до анализа хранили при –20 °С. Состав ЖК в суммарных липидах клеток каллусных культур, а также

их количество, выраженное как масса этерифицирующих ЖК в 1 г сырой или сухой массы клеток, определяли с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) с использованием хроматографа Agilent 7890A (Agilent, США) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975С, как описано ранее [36]. Индекс ненасыщенности (ИН) ЖК, олеил- и линолеилдесатуразные отношения (ОДО и ЛДО соответственно) рассчитывали по следующим формулам [37]:

$$\text{ИН} = (P_i e_i)/100, \quad (3)$$

где P_i — массовая доля i -й ЖК в смеси МЭЖК, e_i — число двойных связей в цепи i -й ЖК [38].

$$\text{ОДО} = \frac{(\%18:2 + \%18:3)}{(\%18:1 + \%18:2 + \%18:3)}, \quad (4)$$

$$\text{ЛДО} = \%18:3/(\%18:2 + \%18:3), \quad (5)$$

где %18:1, %18:2, %18:3 — массовые доли соответствующих ЖК от общего содержания ЖК.

Содержание суммарных липидов ($СЛ_{DW}$) в пересчете на этерифицированные ЖК в 1 г сухой массы (DW) рассчитывали по формуле:

$$СЛ_{DW} = \frac{\sum P_i \cdot 1000}{m_{FW}}, \quad (6)$$

где $\sum P_i$ — сумма абсолютных значений содержания i -й ЖК в анализируемой пробе (мг), m_{FW} — масса навески сырой (FW) каллусной ткани (мг).

Абсолютное значение массы каждой ЖК (P_i , мкг) в анализируемой пробе определяли по формуле:

$$P_i = \frac{10^5 \cdot P_{17:0} \cdot S_i}{S_{17:0} - c_{17:0} \cdot \frac{\sum S_i - S_{17:0}}{100}}, \quad (7)$$

где $P_{17:0}$ — масса добавленного в пробу внутреннего стандарта (маргариновой кислоты) (мг); S_i — площадь пика i -го МЭЖК на хроматограмме; $S_{17:0}$ — площадь пика метилового эфира маргариновой кислоты на хроматограмме; $c_{17:0}$ — содержание эндогенной маргариновой кислоты в пробе, полученное в результате ГЖХ-МС анализа пробы МЭЖК, но без добавления внутреннего стандарта (эндогенную $S_{17:0}$ находили как отношение площади пика $S_{17:0}$ к сумме площадей пиков остальных МЭЖК) (%); $\sum S_i$ — сумма площадей пиков всех МЭЖК на хроматограмме [39].

Анализ фитохимического состава вторичных метаболитов

Для качественного анализа вторичных метаболитов в биомассе каллусных культур клеток *A. persarum* использовали ультраэффективную

жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ МС).

Подготовка проб для УЭЖХ МС. Навеску измельченного растительного материала (70 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70%-ного (об.%) этилового спирта в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12; «Сапфир», Россия), после чего центрифугировали при 4140 g в течение 10 мин (микроцентрифуга МЦФ, ООО «Системы анализа», Россия) и отбирали супернатант в колбу для упаривания. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом при 40 °С. Полученный экстракт суспендировали в 1 мл 5%-ного (об.%) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл 5%-ного (об.%) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 40 °С. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1) и наносили на хроматографическую колонку (объем инъекции 1 мкл).

УЭЖХ МС. Анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters), в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100–2 000). 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%-ный (об.%) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1%-ный (об.%) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). При выполнении всех анализов использовали градиентный режим элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, об.%) : 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 проводили с помощью программы MassLynx (Waters, США).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам. На графиках

и в таблицах представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения (SD), рассчитанные по 3 биологическим повторам (по 3 чашки или по 3 фиксированных объема биологического материала на точку) для каждого срока, пассажа и варианта культивирования. Стандартные отклонения менее 10% от величин средних значений на графиках не отображали. Бары на диаграммах соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95%-ном уровне вероятности по t -критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение каллусных культур клеток *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse

Для определения факторов, влияющих на интенсивность каллусогенеза верблюжьей колючки, использовали различные типы эксплантов и различные среды культивирования. Экспланты отличались по происхождению (дикорастущее интактное растение или стерильные проростки) и по органу, из которого они были изолированы (для интактного растения — листья и фрагменты стебля различной толщины, для проростков — гипокотиль, стебель, семядольные листья).

Используемые для каллусогенеза среды различались по составу углеводов (сахароза или глюкоза) и регуляторов роста (НУК, 2,4-Д, кинетин и БАП). Известно, что семена *Alhagi* spp. имеют относительно низкую всхожесть, поэтому для их прорастания после стерилизации использовали три варианта сред, различающихся по составу углеводов (сахароза или глюкоза) и витаминов. Различий в интенсивности прорастания на используемых средах обнаружено не было. Из образовавшихся проростков в качестве эксплантов использовали гипокотиль (на 5 сутки после прорастания), стебли и листья (через 8 сут после появления первого листа).

Все типы эксплантов *A. persarum* помещали на 6 вариантов сред (см. табл. 2, среды 5–10) и инкубировали около 25 сут. Начало каллусогенеза наблюдали на 12–14 сутки. В результате установлено, что основным фактором, определяющим интенсивность каллусогенеза *A. persarum*, является происхождение экспланта. Наиболее интенсивный каллусогенез (практически 100%, причем независимо от состава используемой среды) наблюдали на эксплантах, полученных из стерильных проростков. У эксплантов от интактных растений результаты были гораздо хуже. На эксплантах от листьев и «толстых» старых стеблей каллусогенез вообще не зарегистрирован. Каллусы образовывались лишь на фрагментах тонких молодых зеленых побегов, но интенсивность каллусогенеза была не выше 30% (табл. 3).

Влияние типа экспланта на интенсивность каллусогенеза *A. persarum*

The effect of explant type on the intensity of callusogenesis for *A. persarum*

Эксплант	Среда	Интенсивность каллусогенеза, %	
Интактные растения	«Тонкие» молодые стебли	Среды 5–10	12–33
	«Толстые» стебли, листья	Среды 5–10	—
Стерильные проростки	Гипокотиль, стебель, листья	Среды 5–10	95–100

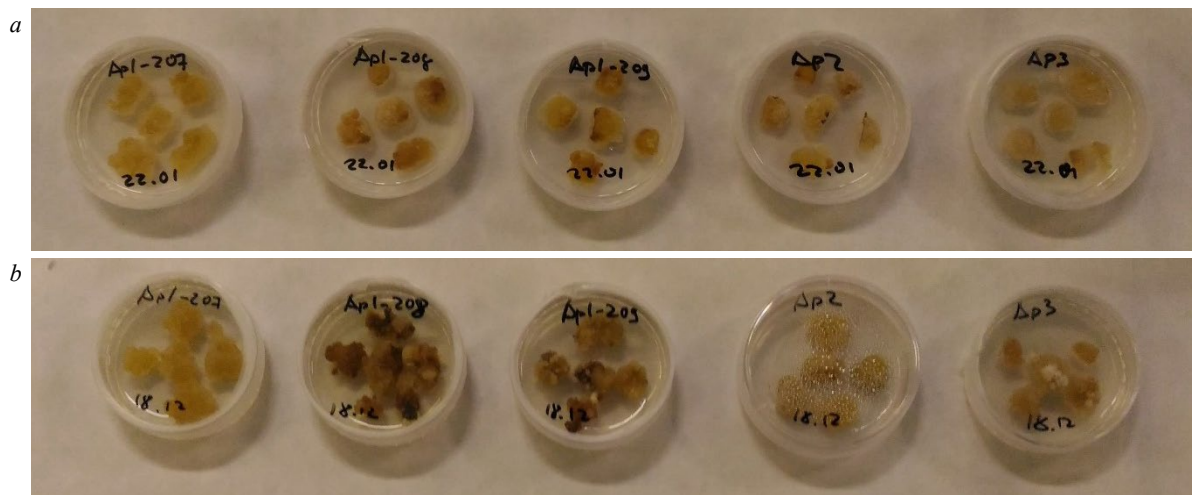


Рис. 2. Каллусные культуры клеток *A. persarum* линий (слева–направо) Ap1-207, Ap1-208, Ap1-209, Ap2-207, Ap3-207. Фотографии сделаны на 30 сутки 8 цикла (a) и 25 цикла (b) субкультивирования.

Fig. 2. *A. persarum* callus cell cultures, lines (from left to right) Ap1-207, Ap1-208, Ap1-209, Ap2-207, Ap3-207. The photographs were taken on the 30th day of cycle 8 (a) and cycle 25 (b) of subcultivation.

Первичный каллус отделяли от остатков растительных эксплантов и переносили на свежую питательную среду. Дальнейший цикл выращивания культуры составлял 4–5 недель (30–35 сут). В результате для каждого из используемых эксплантов от стерильных проростков и на всех используемых вариантах сред было получено более 20 линий каллусных культур клеток, отличающихся по морфологии и интенсивности роста. Большинство полученных линий каллусных культур имело плотную консистенцию и низкую степень оводненности клеток (соотношение сухая масса клеток/сырая масса клеток было в диапазоне 1/8–1/10). Цвет культур был желтоватый и желтовато-бурый, иногда коричневый, реже образовывался более рыхлый светлый каллус.

Через 8 циклов субкультивирования для первичного анализа физиологических и биохимических характеристик было отобрано 5 линий каллусных культур клеток: Ap1-207, Ap1-208, Ap1-209 (среда 8), Ap2-207 (среда 9) и Ap3-207 (среда 10). Все отобранные каллусы были получены из фрагментов гипокотилей проростков (рис. 2).

Проанализирован прирост выбранных линий по сырой биомассе, повторный анализ провели

на 25 цикле субкультивирования. Полученные результаты для 8 и 25 циклов субкультивирования представлены на рис. 3.

Следует отметить, что за полтора года выращивания рост всех линий улучшился в 1,1–1,5 раза, что свидетельствует о характерном для клеток растений *in vitro* отборе по пролиферативной активности. Для химического анализа полученных каллусных культур была выбрана наиболее стабильная по физиологическим показателям линия Ap1-207.

Качественный состав и количество ЖК в суммарных липидах клеток каллусных культур

В табл. 4 и на рис. 4 представлены результаты хроматографического анализа МЭЖК суммарных липидов и полный ЖК-состав для линии Ap1-207.

Идентифицировано 19 индивидуальных C₁₂–C₂₄ ЖК, из которых главными были (>90% от суммы ЖК) пальмитиновая, стеариновая, линолевая и α-линоленовая кислоты. Суммарное содержание минорных ЖК: лауриновой, миристиновой, пентадекановой, гексадеценовых (Δ7– и Δ9–16:1), нонадекановой, арахидиновой, бегеновой, лигноцериновой — не превышало 2%. (табл. 4.)

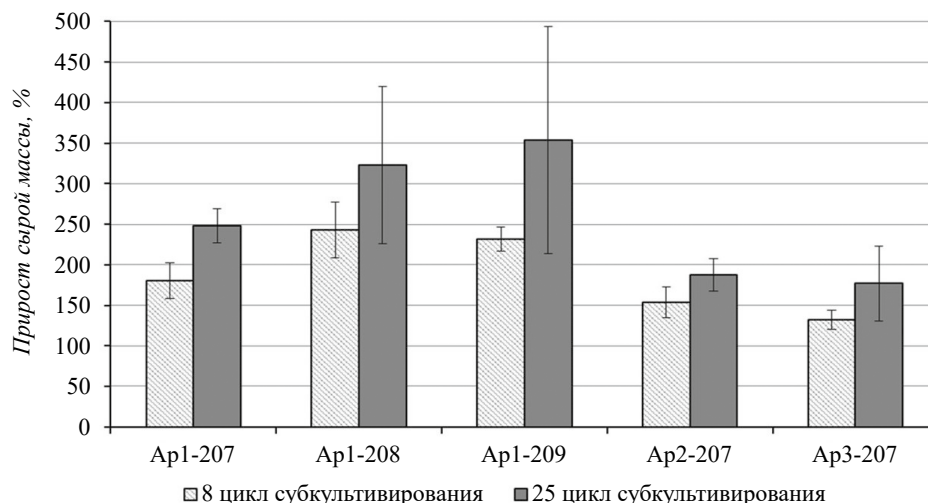


Рис. 3. Прирост сырой массы калусных культур клеток *A. persarum*. Линии Ap1-207, Ap1-208, Ap1-209, Ap2-207, Ap3-207 на 8 и 25 цикле субкультивирования.

Fig. 3. The increase in fresh weight of *A. persarum* callus cell cultures, lines Ap1-207, Ap1-208, Ap1-209, Ap2-207, Ap3-207 for 8th and 25th cycles of subcultivation.

Таблица 4

ЖК-состав суммарных липидов из биомассы калусной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207) на 28 сутки выращивания

Fatty acid composition of total lipids from the biomass of *A. persarum* callus cell culture (Ap1-207 line) on the 28th day of subcultivation

Линия	Жирные кислоты, масс. %						Прочие
	16:0	18:0	18:1 Δ^9	18:1 Δ^{11}	18:2 $\Delta^{9,12}$	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	
Ap1-207	23,4 \pm 1,6	21,8 \pm 1,6	5,0 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	14,3 \pm 1,0	32,9 \pm 0,8	1,0

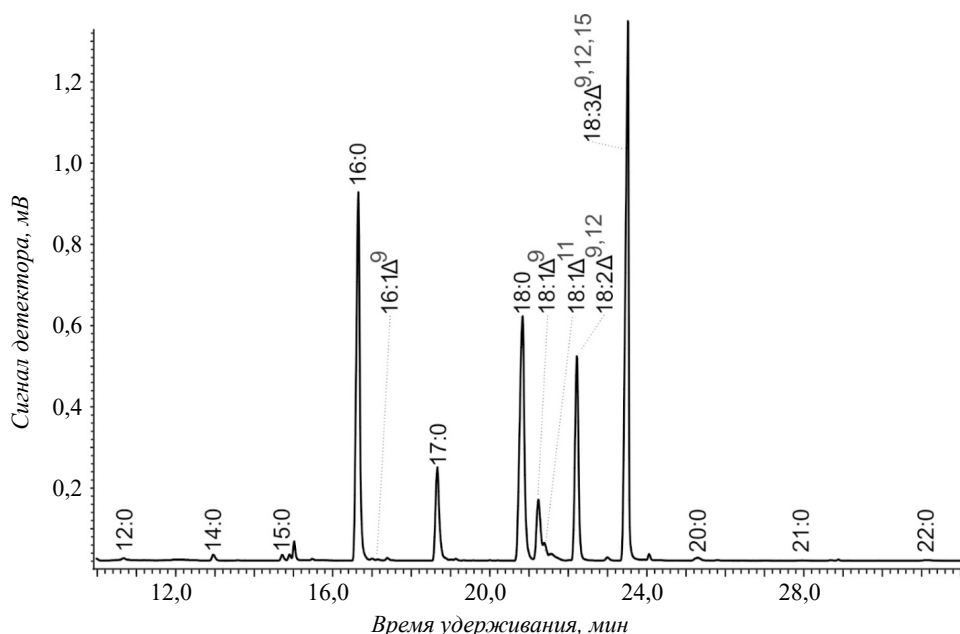


Рис. 4. Разделение метиловых эфиров жирных кислот суммарных липидов из биомассы калусной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207, 28 сутки выращивания) методом ГЖХ-МС. Хроматограмма записана в режиме суммарного ионного тока при регистрации положительных ионов; 17:0 — внутренний стандарт (маргариновая кислота).

Fig. 4. Separation of fatty acid methyl esters of total lipids from the biomass of *A. persarum* callus cell culture (line Ap1-207, 28 days of cultivation) by GLC-MS. The chromatogram was recorded in the total ion current mode when registering positive ions; 17:0 — an internal standard (margaric acid).

Содержание и структурная характеристика суммарных липидов в пересчете на этерифицированные ЖК из биомассы каллусной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207) на 28 сутки выращивания, индекс их ненасыщенности, олеoil- и линелоилдесатуразные отношения

Content and structural characteristics of total lipids in terms of esterified FA from biomass of *A. persarum* callus cell culture (Ap1-207 line) on the 28th day of subcultivation, their unsaturation index, oleoil- and lineloyl-desaturase ratios

Линия	Содержание липидов		ИН	ОДО	ЛДО
	мг/г сырой массы клеток	мг/г сухой массы клеток			
Ap1-207	1,1±0,1	18,8±2,1	1,339±0,011	0,88±0,01	0,70±0,02

Примечание: ИН – индекс ненасыщенности, ОДО — олеoilдесатуразное отношение, ЛДО — линелоилдесатуразное отношение.

Note: The unsaturation index and oleoil desaturase and lineloyl desaturase ratios are present.

Суммарные липиды характеризовались высоким содержанием насыщенных кислот, пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0), и полиненасыщенной α -линоленовой (18:3) кислоты — на них приходилось около 80% всех ЖК. Несмотря на высокое содержание насыщенных ЖК (их доля составляла более 45%), суммарные липиды характеризовались достаточно высоким значением ИН (1,339±0,011 отн. ед.) (табл. 5), что обусловлено главным образом высоким уровнем α -линоленовой кислоты.

Следует отметить, что в литературе, посвященной исследованиям растений из рода *Alhagi*, практически нет полных сведений о ЖК-составе как суммарных липидов, так и их отдельных классов. Одна из подобных работ, Nishanbaev et al. [40], посвящена анализу летучих органических соединений (эфирным маслам) с высоким содержанием пальмитиновой кислоты.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что высокий уровень насыщенных ЖК, компенсируемый высоким содержанием 18:3 ЖК, может быть обусловлен адаптацией клеток к культивированию при постоянных контролируемых значениях температуры в пределах 26±1 °С и влажности в диапазоне 70–75%. В связи с этим представляет интерес оценить способность всех полученных каллусных линий адаптироваться к определенным температурам культивирования, сравнить их по эффективности и/или скорости процессов десатурации стеариновой кислоты, а также изучить особенности распределения ацилов ЖК между разными классами фосфо- и гликолипидов.

Исследование фитохимического состава вторичных метаболитов

Фитохимический анализ полученных каллусных культур проводили методом УЭЖХ МС в режиме детектирования положительно

заряженных ионов, так как в этом случае при электрораспылительной ионизации для многих природных соединений часто наблюдается фрагментация (с образованием характеристических осколочных ионов) уже в источнике ионизации [41]. Это позволяет быстро проводить структурную идентификацию метаболитов с использованием небольшого числа хроматографических процедур. На рис. 5 представлена хроматограмма УЭЖХ МС, записанная в режиме полного ионного тока, разделения компонентов водно-спиртового экстракта биомассы линии Ap1-207 (28 сутки выращивания). Видно, что основными в количественном отношении (на основании интенсивности сигналов соответствующих хроматографических пиков) были 9 соединений, которые элюировались с колонки в интервале 2–6 мин. В порядке увеличения гидрофобности (время элюирования с хроматографической колонки с обращенной фазой) эти соединения обозначены номерами 1–9.

Структурную идентификацию соединений проводили на основании расшифровки результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул в источнике ионизации), анализа относительного хроматографического поведения соединений и сопоставления этих результатов с данными литературы [42–44]. Результаты идентификации представлены в табл. 6.

Общий анализ масс-спектров обнаруженных соединений позволяет распределить их на три группы: соединения 1, 4–7 (группа 1), соединение 2 (группа 2), соединения 3, 8 и 9 (группа 3). Для каждой из этих групп метаболитов наблюдаются общие особенности масс-спектров.

В масс-спектрах соединений 1, 4–7 присутствуют два интенсивных сигнала, разность между значениями m/z которых составляет 248 Да. Например, в масс-спектре соединения 1 присутствуют сигналы с m/z 533,1 и 285,1.

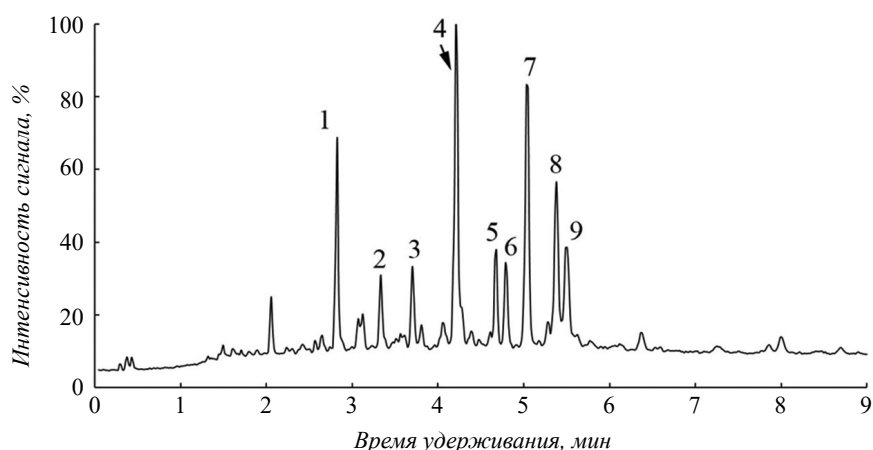


Рис. 5. Анализ состава водно-спиртового экстракта биомассы каллусной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207, 28 суток выращивания) методом УЭЖХ МС (колонка ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, Ирландия)). Хроматограмма записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов. 1–9 — пики идентифицированных соединений (см. табл. 6).

Fig. 5. Analysis of the composition of an aqueous-alcoholic extract of the biomass of *A. persarum* callus cell culture (line Ap1-207, 28 days of cultivation) by UPLC MS. The chromatogram was recorded in the full ion current mode when registering positive ions. 1–9 — peaks of identified compounds (see tab. 6).

Таблица 6

Идентификация компонентов водно-спиртового экстракта биомассы каллусной культуры клеток *A. persarum* (линия Ap1-207, 28 суток выращивания)*

Identification of the components of the aqueous-alcoholic extract of the biomass of *A. persarum* callus cell culture (line Ap1-207, 28 days of cultivation)*

Номер пика	t_R , мин	Масс-спектры, m/z			Результаты идентификации
		$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[Агликон+H]^+$	
1	2,81	533,1	555,1	285,1 $[M+H-Glc-Mal]^+$	Каликозин-7-О-Glc-О-Mal
2	3,33	431,1	453,1	269,1 $[M+H-Glc]^+$	Формононетин-7-О-Glc
3	3,70	285,1	307,1	—	Каликозин
4	4,21	517,1	539,1	269,1 $[M+H-Glc-Mal]^+$	Формононетин-7-О-Glc-О-Mal
5	4,68	547,1	569,1	299,1 $[M+H-Glc-Mal]^+$	Изоафрормозин-7-О-Glc-О-Mal
6	4,79	533,1	555,1	285,1 $[M+H-Glc-Mal]^+$	Глицитеин-7-О-Glc-О-Mal
7	5,03	519,1	541,1	271,1 $[M+H-Glc-Mal]^+$	Генистеин-7-О-Glc-О-Mal
8	5,38	269,1	291,1	—	Формононетин
9	5,50	299,1	321,1	—	Изоафрормозин

*Примечание: t_R — время удерживания на хроматографической колонке, мин; результаты масс-спектрометрии представлены как величина m/z для указанных ионов; Glc — остаток глюкопиранозы; Mal — остаток малоновой кислоты.

*Note: t_R — retention time, min; data of mass spectra are indicated as m/z values for detected ions; Glc — glucopyranose residue; Mal — malonic acid residue.

На основании данных литературы [42–44] сигналы молекулярных ионов с наибольшими значениями m/z могут быть идентифицированы как протонированные молекулы соответствующих соединений ($[M+H]^+$). Сигналы с наименьшим значением m/z , по всей

видимости, соответствуют осколочным ионам, образующимся из $[M+H]^+$ в источнике ионизации в результате нейтральной потери ацилированного малоновой кислотой остатка глюкозы (нейтральная потеря 248 Да, $C_9H_{12}O_8$) [45]. Справедливость идентификации

молекулярного иона $[M+H]^+$ подтверждается наличием в масс-спектрах обнаруженных соединений ионов-аддуктов $[M+Na]^+$. Полученные результаты позволяют предположить, что соединения 1, 4–7 имеют структуру малонилированных глюкозидов изофлавонов. По всей видимости, в качестве агликонов этих гликозидов выступают следующие изофлавоны [42–44]: каликозин для гликозида 1, формонетин для гликозида 4, изомер афрормозина для гликозида 5, глицитеин для гликозида 6 и генистеин для гликозида 7.

В масс-спектре положительных ионов соединения 2 присутствуют два интенсивных сигнала, которые были идентифицированы как $[M+H]^+$ и образующийся из него в результате нейтральной потери остатка глюкозы (нейтральная потеря $C_6H_{10}O_5$, 162 Да) осколочный ион. Таким образом, данный гликозид имеет структуру глюкозида формонетина. В пользу этого вывода свидетельствует относительное хроматографическое поведение гликозида 2 — элюируется с обращенной фазы колонки раньше советующего эфира с малоновой кислотой (гликозид 4) [42, 44].

Соединения 3, 8 и 9 советуют изофлавоном каликозину, формонетину и изомеру афрормозина. В масс-спектрах этих соединений присутствует один интенсивный сигнал $[M+H]^+$.

Таким образом, все обнаруженные соединения относятся к группе изофлавонов. Эти вторичные метаболиты широко распространены среди растений семейства *Fabaceae* [46]. Однако у представителей рода *Alhagi* spp. изофлавоны встречаются редко [19, 47, 48]. В частности, в доступной литературе отсутствуют данные о наличии малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi* spp.

В результате проведенной работы показано, что источник экспланта является важным фактором, влияющим на инициацию каллусов *A. persarum*. Наиболее интенсивный каллусогенез вне зависимости от состава используемой питательной среды был получен в основном на эксплантах из различных органов стерильных проростков, а не интактных растений. Обнаруженная закономерность может быть обусловлена спецификой существования вида *Alhagi* spp.: экстремальные условия температуры (высокие значения и резкая смена — как циркадная, так и сезонная) и влажности. Это может способствовать формированию клеточных механизмов устойчивости большинства клеток интактного растения в «ущерб» их пролиферативному потенциалу, который важен для формирования каллусов. Однако эта

гипотеза, безусловно, требует экспериментального подтверждения.

В результате анализа содержания суммарных липидов в каллусах *A. persarum* показано, что практически половина всех ЖК клеток *in vitro* представлена насыщенными кислотами: пальмитиновой и стеариновой, — а треть — полиненасыщенной α -линоленовой кислотой. Такой нетипичный состав ЖК может быть обусловлен адаптацией клеток к культивированию *in vitro* при постоянных контролируемых значениях температуры и влажности.

Установлено, что в культивируемых *in vitro* клетках *A. persarum* сохраняется способность к образованию вторичных метаболитов. В этих клетках обнаружены соединения, относящиеся к различным структурным группам изофлавонов. Идентифицированы агликоны (каликозин, формонетин, изомер афрормозина), глюкозиды (гликозид формонетина), а также эфиры глюкозидов (малонилгликозиды каликозина, формонетина, изомера афрормозина, глицитеина и генистеина). Обнаруженные вторичные метаболиты широко распространены среди растений семейства *Fabaceae*, однако у представителей *Alhagi* spp. изофлавоны встречаются редко. Присутствие малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi* spp. показано впервые.

Полученные результаты согласуются с выдвинутым нами ранее предположением о специфике вторичного метаболизма в клетках высших растений в системе *in vitro*. Необходимо отметить, что идентификация обнаруженных соединений носит скрининговый характер и для более строгого структурного и количественного описания обнаруженных соединений и выяснения закономерностей их накопления в культурах клеток *A. persarum* требуются дополнительные исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект № 18-54-06021 (Аз_а)) и Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882). Работы по получению культур клеток и анализу ростовых характеристик были проведены с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» Института физиологии растений Российской академии наук (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

ЛИТЕРАТУРА

- Atta A.H., Mouneir S.M. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 92(2–3), 303–309. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.017
- Amani A.S., Maitland D.J., Soliman G.A. Antiulcerogenic activity of *Alhagi maurorum*. *Pharm. Biol.*, 2006, 44(4), 292–296. doi 10.1080/13880200600714160
- Naseri M.K.G., Mard S.A. Gastroprotective effect of *Alhagi maurorum* on experimental gastric ulcer in rats. *Pak. J. Med. Sci.*, 2007, 23(4), 570–573. <https://www.pjms.com.pk/issues/julsep07/pdf/alhagi.pdf>
- Alqasoumi S.I., Al-Rehaily A.J., AlSheikh A.M., Abdel-Kader M.S. Evaluation of the hepatoprotective effect of *Ephedra foliata*, *Alhagi maurorum*, *Capsella bursa-pastoris* and *Hibiscus sabdariffa* against experimentally induced liver injury in rats. *Nat. Prod. Sci.*, 2008, 14(2), 95–99. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200824067121756.pdf>
- Al-Douri N.A., Al-Essa L.Y. A survey of plants used in Iraqi traditional medicine. *Jordan J. Pharm. Sci.*, 2010, 3(2), 100–108. Corpus ID: 55863621
- Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S. Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn). *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48(10), 2785–2790. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.007
- Neamah N.F. A Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Alhagi maurorum*. *Global J. Pharmacol.*, 2012, 6(1), 41–46. Corpus ID: 34561203
- Amiri M., Pouliot P., Bonnéry C., et al. An exploration of the effect of hemodynamic changes due to normal aging on the fNIRS response to semantic processing of words. *Front. Neurol.*, 2014, 5, 249. doi: 10.3389/fneur.2014.00249
- Marashdah M.S., Al-Hazimi H.M. Pharmacological activity of ethanolic extract of *Alhagi maurorum* roots. *Arabian J. Chem.*, 2010, 3(1), 39–42. doi: 10.1016/j.arabjc.2009.12.007
- Marashdah M.S., Farraj A.L. Pharmacological Activity of 2% aqueous acetic acid extracts of *Alhagi maurorum* roots. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2010, 14(3), 247250. doi: 10.1016/j.jscs.2010.02.015
- Abu Taleb A.M., El-Deeb K., Alotibi F.O. Bioactivity of some plant extracts against *Drechslera biseptata* and *Fusarium solani*. *J. Food Agr. Environ.*, 2011, 9(3), 769–774. <https://doi.org/10.1234/4.2011.2408>
- Awaad A.S., El-Meligy R.M., Qenawy S.A., et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of some desert plants. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2011, 15(4), 367–373. doi: 10.1016/j.jscs.2011.02.004
- Rahman S.M.A., Abd-Ellatif S.A., Deraz S.F., Khalil A.A. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: natural alternatives for infectious disease treatment. *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, 10, 10733–10743. doi: 10.5897/AJB11.007
- Saatchi A., Kadivar M., Zad S.S., Abaee M.S. Application of some antifungal and antioxidant compounds extracted from some herbs to be used in cakes as biopreservatives. *J. Agr. Sci. Tech. Iran.*, 2014, 16, 561–568. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-5655-en.html>
- Towhidi A. Nutritive value of some herbages for dromedary camel in Iran. *Pak. J. Biol. Sci.*, 2007, 10(1), 167–170. doi: 10.3923/pjbs.2007.167.170
- Towhidi A., Zhandi M. Chemical composition, *in vitro* digestibility and palatability of nine plant species for dromedary camels in the province of Semnan, Iran. *Egypt. J. Biol.*, 2007, 9, 47–52. <https://www.ajol.info/index.php/ejb/article/view/56553>
- Piri A., Palangi A., Eivazi P. The determination of nutritive value of *Alhagi* by *in situ* and gas production techniques. *Eur. J. Exp. Biol.*, 2012, 2(3), 846–849. <https://www.imedpub.com/abstract/the-determination-of-nutritive-value-of-ialhagii-by-iin-situi-and-igas-production-techniquesi-16432.html>
- Ahmad S., Riaz N., Saleem M., et al. Antioxidant flavonoids from *Alhagi maurorum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2010, 12(2), 138–143. doi: 10.1080/10286020903451724
- Muhammad G., Hussain M.A., Anwar F., et al. *Alhagi*: a plant genus rich in bioactives for pharmaceuticals. *Phytother. Res.*, 2015, 29(1), 1–13. doi: 10.1002/ptr.5222
- Georgiev M., Weber J., Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 83, 809–823. doi: 10.1007/s00253-009-2049-x
- Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro*. *Физиология растений*, 1994, 41(6), 873–878.
- Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors. In: *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Eds K.-Y. Paek, et al., Springer Science+Business Media Dordrecht, 2014, 563–623. doi: 10.1007/978-94-017-9223-3_23
- Kochkin D.V., Kachala V.V., Shashkov A.S., et al. Malonyl-ginsenoside content of a cell-suspension culture of *Panax japonicus* var *repens*. *Phytochemistry*, 2013, 93, 18–26. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.03.021
- Kochkin D.V., Khandy M.T., Zaitsev G.P., et al. Protodioscin in *Dioscorea deltoidea* suspension cell culture. *Chem. Nat. Compd.*, 2016, 52(4), 664–668. doi: 10.1007/s10600-016-1734-0
- Khandy M.T., Titova M.V., Konstantinova S.V., et al. Formation of protodioscin and deltoside isomers in suspension cultures of nepal yam (*Dioscorea deltoidea* Wall.) cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52(6), 657–662. doi: 10.1134/S0003683816060077
- Awmack C.S., Lock J.M. The Genus *Alhagi* (*Leguminosae: Papilionoideae*) in the Middle East. *Kew Bull.*, 2002, 57(2), 435–443. doi: 10.2307/4111121

27. Bharal, S., Rashid, A. Tissue culture of *Alhagi camelorum* — a legume of high regenerative capacity. *Physiol. Plant.*, 1981, 53, 497–500. doi: 10.1111/j.1399-3054.1981.tb02739.x
28. Hassanein A.M., Mazen A.M.A. Adventitious bud formation in *Alhagi graecorum*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 2001, 65, 31–35. doi: 10.1023/A:1010637407780
29. Wang Y.M., Wang B.J., Luo D., Jia F.J. Regeneration of plants from callus tissue of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi*. *Cell Res.*, 2001, 11(4), 279–284. doi: 10.1038/sj.cr.7290097
30. Honari M., Askari H., Khosrowchahli M. Use of desirability function method in optimization of regeneration and callus induction of *Alhagi camelorum*. *Am. J. Plant Sci.*, 2014, 5(3), 268–274. doi: 10.4236/ajps.2014.53036
31. Ashish M., Jain P., Lata S., Rani Sehrawat A. Silver nanoparticles from embryogenic calli of *Alhagi maurorum*. *Asian J. Pharm.*, 2018, 12 (1), 224–227. doi: 10.22377/ajp.v12i01.2065
32. Hassanein A.M. Hormonal requirements induced different regeneration pathways in *Alhagi graecorum*. *J. Plant Biotechnol.*, 2004, 6(3), 171–179. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200411923074207.pdf>
33. Dhaniya S., Parihar S.K. *In-vitro* callus induction and multiplication of inter-nodal explants in plants *Dicoma tomentosa* and *Alhagi maurorum*. *J. Drug Delivery Ther.*, 2019, 9(4-A), 212–219. doi: 10.22270/jddt.v9i4-A.3455
34. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15, 473–479. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
35. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, 50, 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
36. Sidorov R. A., Zhukov A.V., Pchelkin V.P., et al. Content and fatty acid composition of neutral acylglycerols in *Euonymus* fruits. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2014, 91(5), 805–814. doi: 10.1007/s11746-014-2425-2
37. Bhogal N.S., Bala M., Kumar Set., et al.. Distribution of (n-9) and (n-7) isomers of monounsaturated fatty acids in indian mustard (*Brassica juncea*). *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 91(3), 463–470. doi: 10.1007/s11746-013-2387-9
38. Lyons L.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. Relations between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.*, 1964, 39(2), 262–268. doi: 10.1104/pp.39.2.262
39. Жуков А.В., Верещагин А.Г. Гептадеценовая кислота как внутренний стандарт в газо-хроматографическом определении веса жирных кислот. *Ж. аналит. химии*, 1970, 25(11), 2222–2227.
40. Nishanbaev S.Z., Bobakulov K.M., Nigmatullaev A.M., et al. Volatile compounds from the aerial parts of four *Alhagi* species growing in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.*, 2016, 52(1), 167–170. doi: 10.1007/s10600-016-1582-y
41. Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2011, 46(5), 478–488. doi: 10.1002/jms.1914
42. Zhang J., Xu X.J., Xu W., et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, 2015, 53(6), 945–952. doi: 10.1093/chromsci/bmu155
43. Lee Y.H., Kim B., Hwang S.-R., et al. Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems. *J. Food Drug Anal.*, 2018, 26(1), 277–291. doi: 10.1016/j.jfda.2017.05.005
44. Zheng Y., Duan W., Sun J., et al. Structural identification and conversion analysis of malonyl isoflavonoid glycosides in *Astragali radix* by HPLC coupled with ESI-Q TOF/MS. *Molecules*, 2019, 24(21), 3929. doi: 10.3390/molecules24213929
45. Aguiar C.L., Haddad R., Eberlin M.N., et al. Thermal behavior of malonylglucoside isoflavones in soybean flour analyzed by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. *LWT—Food Sci. Technol.*, 2012, 48(1), 114–119. doi: 10.1016/j.lwt.2012.02.017
46. Wink M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.*, 2013, 89, 164–175. doi: 10.1016/j.sajb.2013.06.006
47. Li N., Zhang G., Xiong Y., et al. New isoflavonolignan with quinone reductase inducing activity from *Alhagi pseudoalhagi* (M.B.). *Fitoterapia*, 2010, 81(8), 1058–1061. doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.031
48. Guo D., Xue W.J., Zou G.A., Aisa H.A. Chemical composition of *Alhagi sparsifolia* flowers. *Chem. Nat. Compd.*, 2016, 52(6), 1095–1097. doi: 10.1007/s10600-016-1871-5

Obtaining and Characterization of *Alhagi persarum* Boiss. et Buhse Callus Cell Cultures, Isoflavonoid Producers

M.V. TITOVA^{1*}, D.V. KOCHKIN^{1,2}, G.I. SOBOLKOVA¹, A.A. FOMENKOV¹, R.A. SIDOROV¹, and A.M. NOSOV^{1,2}

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences (IPP RAS), Moscow, 127276, Russia

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: titomirez@mail.ru

Received June 6, 2020

Revised July 24, 2020

Accepted December 1, 2020

Abstract—The physiological characteristics of the callus cell cultures of *Alhagi persarum* Boiss et Buhse, a member of the legume family, widely used in folk medicine, have been studied. It was shown that the source of the explant was an important factor in the initiation of callusogenesis: more intense callusogenesis (almost 100%) was observed for explants from various organs of sterile seedlings, rather than intact plants (less than 30%). As a result, more than 20 lines of morphologically different callus cell cultures were obtained, and the growth parameters for the 5 most intensively growing lines were determined. The composition of fatty acids (FA) of total lipids and secondary metabolites in the most physiologically stable callus line Ap-207 was analyzed. Using capillary gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection (GLC-MS), 19 individual C12–C24 FAs were identified, the main fraction of which were palmitic (~ 23%), stearic (~ 22%), linoleic (~ 14%) and α -linolenic (~ 33%) acids. The established atypical ratio of FAs (a simultaneous high content of both saturated FAs and polyunsaturated α -linolenic acid) is possibly due to the adaptation of cells to in vitro growth conditions. Phytochemical analysis of the secondary metabolites was carried out using ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection (UPLC MS). Compounds belonging to different structural groups of isoflavones were found. Aglycones (calycosin, formononetin and afrormosin isomer), glucosides (formononetin glucoside), as well as esters of glucosides (malonylglycosides of calicosin, formononetin, afrormosin isomers, glycitein and genistein) were detected. These secondary metabolites are widespread in plants of the *Fabaceae* family; however, isoflavones are rare in representatives of the *Alhagi* genus. The presence of malonylated isoflavone glycosides in *Alhagi* spp. was shown for the first time.

Key words: endemic plant species, *Alhagi*, in vitro cell culture, callus cell culture, isoflavones, fatty acids

Acknowledgements—All studies were carried out using the equipment of the “Experimental Biotechnological Facility” and the “All-Russian Collection of Cell Cultures of Higher Plants” of IPP RAS.

Funding—This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), contract no.18-54-06021 (Az_a), and the Government of the Russian Federation, Megagrant Project no. 075-15-2019-1882.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-35-48