

Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ее характеристика

Н. С. Пивоварова✉, Т. С. Шебитченко, О. Н. Абросимова

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Пивоварова Надежда Сергеевна. E-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

ORCID: Н. С. Пивоварова – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Т. С. Шебитченко – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>; О. Н. Абросимова – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 12.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

Резюме

Введение. Выращивание биомассы растительных клеток как метод получения сырья существует довольно долгое время. Растительные клетки, культивируемые *in vitro*, выступают в роли источника ценных вторичных метаболитов, таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды, гликозиды и др. Важно создать такие условия, при которых в штаммах будет наблюдаться накопление ценных биологически активных веществ. Культивирование предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор макро-, микроэлементов, витаминов, стимуляторов роста. Шалфей лекарственный обладает широким спектром фармакологического действия. В связи с ограниченным ареалом произрастания шалфея лекарственного, а также с ухудшением экологической обстановки в регионах произрастания использование фитобиотехнологического метода получения сырья является актуальным.

Цель. Получить жизнеспособную каллусную культуру шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.).

Материалы и методы. В качестве эксплантов использованы листья интактного растения шалфея лекарственного, семейства Яснотковые (*Salvia officinalis*, Lamiaceae). Предварительную стерилизацию эксплантов осуществляли 6%-м раствором гипохлорита натрия в течение 20 минут и этанолом 70%-м – 1 минуты. Культивировали на питательной среде по прописи Мурасиге – Скуга. Определение жизнеспособности клеток с использованием витальных красителей оценивали при помощи микроскопии (микроскоп цифровой Bresser LCD 50x-2000x, Германия). Высокоэффективную тонкослойную хроматографию проводили с использованием системы HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария).

Результаты и обсуждение. После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первичного каллуса. Визуально он представлял собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток светло-жёлтого цвета. В течение культивирования нарастала биомасса полученного каллуса, он становился более рыхлым и приобретал более темный оттенок, также начинала темнеть питательная среда. Обнаруженные клетки при микроскопии можно разделить на два типа: первый тип – клетки меристематического типа, второй тип – клетки паренхимного типа. Микроскопия показала, что более 95 % всех визуализированных клеток живые. В следующих пассажах существенных изменений морфотипа культуры отмечено не было. В одиннадцатом пассаже проведено исследование ростовой активности штамма. Максимальная удельная скорость роста 0,42 сут⁻¹ наблюдается на 14–18 сутки роста, при этом показатель времени удвоения биомассы наименьший и соответствует значению 1,66 суток. За один цикл культивирования количество биомассы увеличивается в 7,73 раза. Результаты качественного анализа методом ВЭТСХ показывают, что качественный состав биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

Заключение. Получен жизнеспособный стабильный штамм растительных клеток шалфея лекарственного на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для следующих пассажей рекомендовано использование питательной среды по прописи Мурасиге – Скуга с полным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами α-нафтилуксусная кислота (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Основную массу полученного гетерогенного каллуса составляют клетки меристематического и паренхимного типа. Качественный состав БАВ биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

Ключевые слова: стерилизация эксплантов, ростовая активность, каллус, питательная среда

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. С. Пивоварова, Т. С. Шебитченко, О. Н. Абросимова осуществили постановку задачи, выполнение эксперимента, обработку полученных данных, обсуждение результатов и написание текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Пивоварова Н. С., Шебитченко Т. С., Абросимова О. Н. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ее характеристика. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):40–46. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46>

Obtaining Callus Culture of Sage Medicinal (*Salvia officinalis* L.) and its Characteristics

Nadezhda S. Pivovarova✉, Tatyana S. Shebitchenko, Olesya N. Abrosimova

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ Corresponding author: Nadezhda S. Pivovarova. E-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

© Пивоварова Н. С., Шебитченко Т. С., Абросимова О. Н., 2022

© Pivovarova N. S., Shebitchenko T. S., Abrosimova O. N., 2022

ORCID: Nadezhda S. Pivovarova – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Tatyana S. Shebitchenko – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>;
Olesya N. Abrosimova – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>.

Received: 06.09.2022 Revised: 12.10.2022 Published: 25.11.2022

Abstract

Introduction. Cultivation of biomass of plant cells as a method of obtaining raw materials has existed for quite a long time. Plant cells cultivated *in vitro* act as a source of valuable secondary metabolites such as phenols, alkaloids, phytosteroids, glycosides, etc. It is important to create conditions under which the accumulation of valuable biologically active substances will be observed in the strains. Cultivation involves the use of complex multicomponent nutrient media containing a certain set of macro-, microelements, vitamins, growth stimulants. *Salvia officinalis* has a wide spectrum of pharmacological action. Due to the limited growing area of medicinal sage, as well as the deterioration of the ecological situation in the growing regions, the use of a phytobiotechnological method for obtaining raw materials is relevant.

Aim. The aim of the study is to obtain a viable callus culture of *salvia officinalis* (*Salvia officinalis* L.).

Materials and methods. Leaves of an intact plant sage medicinal, of the Lamiaceae family (*Salvia officinalis*, Lamiaceae) were used as explants. The explants were pre-sterilized with 6 % sodium hypochlorite solution for 20 minutes and 70 % ethanol for 1 minute. It was cultivated on a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe. Determination of cell viability using vital dyes was assessed using microscopy (digital microscope Bresser LCD 50x-2000x, Germany). High performance thin layer chromatography was performed using a HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Switzerland).

Results and discussion. After two weeks of cultivation, the formation of primary callus was observed on the surface of the explants. Visually, it was a thin layer of intensely dividing undifferentiated light yellow cells. During cultivation, the biomass of the resulting callus increased, it became looser and acquired a darker shade, and the nutrient medium also began to darken. The detected cells during microscopy can be divided into two types: the first type is cells of the meristematic type, the second type is cells of the parenchymal type. Microscopy showed that more than 95 % of all visualized cells are alive. In the following passages, no significant changes in the morphotype of the culture were noted. In the eleventh passage, a study of the growth activity of the strain was carried out. The maximum specific growth rate of 0.42 day⁻¹ is observed on the 14–18th day of growth, while the biomass doubling time is the smallest and corresponds to the value of 1.66 days. During one cultivation cycle, the amount of biomass increases by 7.73 times. The results of a qualitative analysis by the method of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) show that the qualitative composition of the biomass of medicinal sage is generally close to that of intact plants.

Conclusion. A viable stable strain of plant cells of *salvia officinalis* was obtained on a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe with a half content of micro- and macrosols and phytohormones 2,4-D (6 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml). For the following passages, it is recommended to use a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe with a full content of micro and macrosols and phytohormones naphthylacetic acid (1 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml). The bulk of the obtained heterogeneous callus is made up of cells of the meristematic and parenchymal type. The qualitative composition of BAS biomass of medicinal sage is generally close to that of intact plants.

Keywords: sterilization of explants, growth activity, callus, nutrient medium

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Nadezhda S. Pivovarova, Tatyana S. Shebitchenko, Olesya N. Abrosimova carried out the statement of the problem, implementation of the experiment, processing of obtained data, discussion of the results, and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Central Collective Use Center "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SPHFU of the Ministry of Health of Russia" under agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with financial support from the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Pivovarova N. S., Shebitchenko T. S., Abrosimova O. N. Obtaining callus culture of sage medicinal (*Salvia officinalis* L.) and its characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(4):40–46. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46>

ВВЕДЕНИЕ

Выращивание биомассы растительных клеток как метод получения сырья существует довольно долгое время. Растительные клетки, культивируемые *in vitro*, выступают в роли источника ценных вторичных метаболитов таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды, гликозиды и др. [1–6]. Основное направление исследований в этой области заключается в подборе оптимальных составов питательных сред и условий культивирования. Поэтому очень важно создать такие условия, при которых в штаммах будет наблюдаться накопление ценных биологически активных веществ (БАВ). Прежде чем использовать биомассу в качестве лекарственного сырья, необходимо

получить по возможности более полную характеристику роста штамма. Это даст возможность правильно оценить и прогнозировать рациональные сроки и условия для выращивания культуры клеток. Культивирование предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор макро-, микроэлементов, витаминов, стимуляторов роста. Однако не существует универсальных протоколов для получения штаммов – суперпродуцентов [7, 8]. Для каждого вида растений необходимо искать индивидуальный подход, с учетом состава питательных сред, параметров культивирования и т. д. Шалфей лекарственный обладает широким спектром фармакологического действия. Антисептическое, противовоспалительное, болеуто-

ляющее и другие свойства давно применяются как в народной, так и в научной медицине [9, 10]. В связи с ограниченным ареалом произрастания шалфея лекарственного, а также с ухудшением экологической обстановки в регионах произрастания использование фитобиотехнологического метода получения сырья является актуальным [11, 12].

Целью исследования являлось получение жизнеспособной каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве эксплантов использованы листья intactного растения шалфея лекарственного, семейства Яснотковые (*Salvia officinalis*, *Lamiaceae*), культивируемого в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (пос. Лемболово, Ленинградская область).

Гипохлорит натрия (CAS: 7681-52-9, АО «ЛенРеактив», Россия), этанол медицинский 95 % (ООО «РОС-БИО», Россия), калий азотнокислый (CAS № 7757-79-1, АО «БЕКТОН», Россия), аммоний азотнокислый (CAS № 6484-52-2, АО «БЕКТОН», Россия), калий фосфорнокислый 1-замещенный (CAS № 7778-77-0, АО «БЕКТОН», Россия), магний сернокислый, 7-водный (CAS № 10034-99-8, АО «БЕКТОН», Россия), кальций хлористый, 2-водный (CAS № 10035-04-8, АО «БЕКТОН», Россия), натрий молибденовокислый, 2-водный (CAS № 10102-40-6, АО «БЕКТОН», Россия), медь сернокислая(II), 5-водная (CAS № 7758-99-8, АО «БЕКТОН», Россия), борная кислота (CAS № 10043-35-3, АО «БЕКТОН», Россия), марганец сернокислый(II), 5-водный (CAS № 15244-36-7, АО «БЕКТОН», Россия), цинк сернокислый, 7-водный (CAS № 7446-20-0, АО «БЕКТОН», Россия), калий йодистый (CAS № 7681-11-0, АО «БЕКТОН», Россия), кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный (АО «БЕКТОН», Россия), железо сернокислое(II), безводное (АО «БЕКТОН», Россия), трилон Б (CAS № 6381-92-6, АО «БЕКТОН», Россия), тиамин гидрохлорид (CAS № 67-03-8, Merck KGaA, Германия), пиридоксин (CAS № 65-23-6, Merck KGaA, Германия), никотиновая кислота (CAS № 59-67-6, АО «БЕКТОН», Россия), аминокислота (CAS № 56-40-6, АО «БЕКТОН», Россия), мезо-Инозит (CAS № 87-89-8, Merck KGaA, Германия), сахароза (CAS № 57-50-1, АО «БЕКТОН», Россия), агар-агар (ГОСТ 17206-96, ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (CAS № 94-75-7, Merck KGaA, Германия), кинетин (CAS № 525-79-1, Merck KGaA, Германия), Эванс голубой (CAS № 314-13-6, АО «БЕКТОН», Россия), нейтральный красный (CAS № 553-24-2, АО «БЕКТОН», Россия), *n*-бутиловый спирт (CAS № 71-36-3, АО «БЕКТОН», Россия), уксусная кислота ледяная (CAS № 64-19-7, АО «БЕКТОН», Россия), α -нафтилуксусная кислота (НУК) (CAS № 86-87-3, Shijiazhuang Lemandou Chemicals Co., Ltd., Китай).

Методы и оборудование

Подготовка экспланта

Сбор растительного материала – шалфея лекарственного листа производился с соблюдением принципов биологической этики. Предварительную стерилизацию эксплантов осуществляли 6 % раствором гипохлорита натрия в течение 20 минут и этанолом 70 % – 1 минуту.

Приготовление питательной среды по прописи Мурасиге – Скуга (MS)

Состав питательной среды по прописи MS представлен в таблице 1. Предварительно были приготовлены маточные растворы макросолей (калий азотнокислый, аммоний азотнокислый, калий фосфорнокислый 1-замещенный, магний сернокислый, 7-водный, кальций хлористый, 2-водный) и микросолей (натрий молибденовокислый, 2-водный, медь сернокислая(II), 5-водная, борная кислота, марганец сернокислый(II), 5-водный, цинк сернокислый, 7-водный, калий йодистый, кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный), а также железа-хелат (железо сернокислое(II), безводное, трилон Б).

Таблица 1. Среда Мурасиге – Скуга для клеточных и тканевых культур

Table 1. Medium Murasige – Skoog for cell and tissue cultures

Компоненты питательной среды Nutrient medium components	Количество Quantity
Маточный раствор макросолей Concentrated solution of macrosalts	50 мл/л 50 ml/l
Маточный раствор микросолей Concentrated solution of microsals	1 мл/л 1 ml/l
Железа хелат Iron salts	5 мл/л 5 ml/l
Тиамин гидрохлорид Thiamine hydrochloride	1 мг/л 1 ml/l
Пиридоксин Pyridoxine	0,5 мг/л 0,5 mg/l
Никотиновая кислота Nicotinic acid	0,5 мг/л 0,5 mg/l
Мезо-инозит Meso-inositol	100 мг/л 100 mg/l
α -нафтилуксусная кислота α -naphthylacetic acid	2 мг/л 2 mg/l
Сахароза Sucrose	30 г/л 30 g/l
Агар-агар Agar-agar	7 г/л 7 g/l

Примечание. * pH питательной среды 5,6–5,8.

Note. * pH of the nutrient medium 5.6–5.8.

В питательной среде MS было уменьшено содержание маточных растворов макро- и микросолей в два раза и добавлены фитогормоны 2,4-Д в количестве 6 мг/мл и кинетин – 1 мг/мл. Режим стерилизации питательной среды: 15 минут при температуре 120 ± 1 °C.

Внесение экспланта на стерильную питательную среду

В условиях ламинарного шкафа ЛШ-Биоком-1 (ООО «Компания «БИОКОМ», Россия) листовую пластинку рассекали стерильным скальпелем (эксплант длиной 1,5–2 см, шириной 1 см) и помещали на питательную среду. Культивирование осуществляли на протяжении 11 пассажей в темноте, температура 27–28 °С, влажность 60–70 % [7].

Определение жизнеспособности клеток с использованием витальных красителей [11, 13, 14]

В качестве витальных красителей использовали Эванс голубой и нейтральный красный. Результаты окрашивания оценивали при помощи микроскопии (микроскоп цифровой Bresser LCD 50x-2000x, Германия) Микроскопия клеток проводилась с применением техники «давленный» препарат при увеличении 200 и 400.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

ВЭТСХ с использованием системы HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария). Нанесение образцов производили с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG AG, Швейцария) в количествах 2 и 5 мкл на пластины HPTLC Silica gel 60 F254, 20 × 10 см (Merck KGaA, Германия). Далее пластинку помещали в автоматическую камеру CAMAG® Automatic Developing Chamber 2 (ADC2) (CAMAG AG, Швейцария) с системой растворителей бутанол – уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении 4:1:5 соответственно. Элюирование продолжали до тех пор, пока фронт растворителя не достигал 85 мм от линии старта. Изображение получали с помощью CAMAG® TLC Visualize 2 (CAMAG AG, Швейцария). Детекцию пятен осуществляли в видимом и УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм. Полученные хроматограммы обрабатывали в графическом редакторе для нанесения размерной градуировки. Затем полученные пятна соотносили с нанесенной градуировкой и находили фактор удерживания R_f [15].

тины помещали в автоматическую камеру CAMAG® Automatic Developing Chamber 2 (ADC2) (CAMAG AG, Швейцария) с системой растворителей бутанол – уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении 4:1:5 соответственно. Элюирование продолжали до тех пор, пока фронт растворителя не достигал 85 мм от линии старта. Изображение получали с помощью CAMAG® TLC Visualize 2 (CAMAG AG, Швейцария). Детекцию пятен осуществляли в видимом и УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм. Полученные хроматограммы обрабатывали в графическом редакторе для нанесения размерной градуировки. Затем полученные пятна соотносили с нанесенной градуировкой и находили фактор удерживания R_f [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первичного каллуса. Визуально он представлял собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток светло-желтого цвета. Далее первичный каллус переносили на свежую питательную среду по прописи MS с полным содержанием микро – и макроэлементов и фитогормонами: НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). В течение культивирования нарастала биомасса полученного каллуса, он становился более рыхлым и приобретал более темный оттенок, также начинала темнеть питательная среда. Визуализация процесса представлена на рисунке 1.

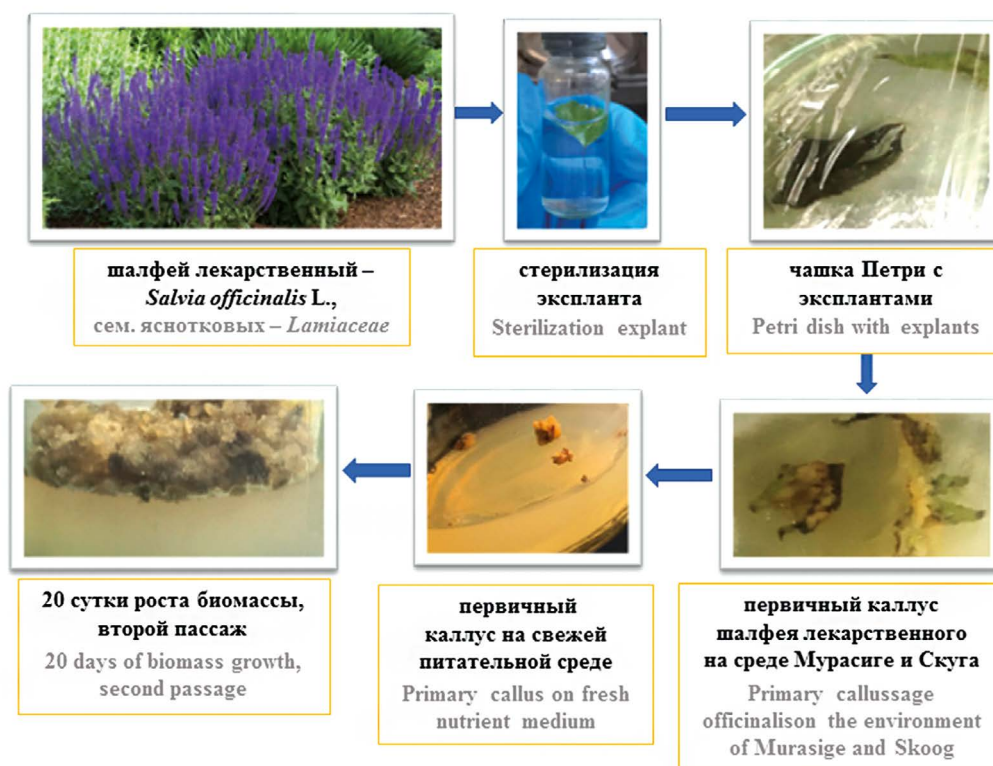


Рисунок 1. Визуализация введения шалфея лекарственного в культуру
Figure 1. Visualization of the introduction of *Salvia officinalis* into culture

После первого пассажа при пересадке часть биомассы взята для микроскопического анализа. Обнаруженные клетки можно разделить на два типа. Первый тип – клетки меристематического типа, которые имеют относительно небольшие размеры, крупные ядра, их вакуолизация слабо выражена. Второй тип – клетки паренхимного типа, которые имеют более крупные размеры и овальную, вытянутую форму. Микроскопия показала, что более 95 % всех визуализированных клеток живые. В следующих пассажах существенных изменений морфотипа культуры отмечено не было. Микроскопия представлена на рисунке 2.

В одиннадцатом пассаже проведено исследование ростовой активности штамма. Известно, что каллусные клетки в процессе роста проходят ряд фаз развития: лаг-фазу, экспоненциальную, стационарную, фазу гибели или дегенерации [16]. При этом наблюдается физиологическая асинхронность клеточной популяции. При помощи таких показателей, как индекс роста, удельная скорость и время удвоения биомассы можно охарактеризовать рост каллусных культур. Аналитические параметры роста каллусной культуры шалфея лекарственного представлены в таблице 2.

Анализируя полученные результаты, стоит отметить, что максимальная удельная скорость роста $0,42 \text{ сут}^{-1}$ наблюдается на 14–18 сутки роста, при этом показатель время удвоения биомассы наименьший и соответствует значению 1,66 суток. За один цикл культивирования количество биомассы увеличивается в 7,73 раза. В дальнейшем оценка показателей роста позволит оптимизировать состав при модификации питательной среды.

Из высушенной биомассы клеток и листьев шалфея лекарственного получены водно-спиртовые вытяжки (70%-й этанол), необходимые для проведения качественного анализа методом ВЭТСХ. Анализ выполнен на кафедре фармакогнозии СПХФУ. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 3.

Таблица 2. Аналитические параметры роста каллусной культуры шалфея лекарственного о одиннадцатый пассаж (приведены среднеарифметические значения результатов трех определений, имеющих отклонение не более 5 %)

Table 2. Analytical parameters of growth of callus culture of sage officinalis eleventh passage (the arithmetic mean values of the results of three determinations with a deviation of no more than 5 % are given)

Фаза роста Growth phase	Сутки роста Days of Growth	Удельная скорость роста (сут^{-1}) Specific growth rate (day^{-1})	Время удвоения биомассы (сут.) Biomass doubling time (day)	Индекс роста Growth index
Латентная Latent	2	0,09	7,62	0,18
Ускорения роста Accelerating growth	4	0,21	3,28	0,85
	7	0,20	3,44	1,41
Экспоненциального роста Exponential growth	11	0,28	2,47	3,09
	14	0,42	1,66	5,85
	18	0,42	1,66	7,53
Замедленного роста Slow growth	22	0,35	1,99	7,67
Стационарная Stationary	27	0,29	2,43	7,71
	30	0,26	2,69	7,73

На хроматограммах были обнаружены вещества с факторами удерживания $R_f = 0,73; 0,6; 0,57; 0,52, 0,45; 0,4; 0,35; 0,27; 0,19$. По данным литературных источников, эти соединения относятся к флавоноидам, фенолокислотам, таннидам, аминокислотам, и соответствуют гидроксикоричной кислоте и гиперозиду, рутину, кверцетину, а также галловой и феруловой кислоте.

Таким образом, результаты показывают, что качественный состав биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений. Исследования по установлению структуры выявленных соединений, является перспективным направлением для дальнейшего изучения.

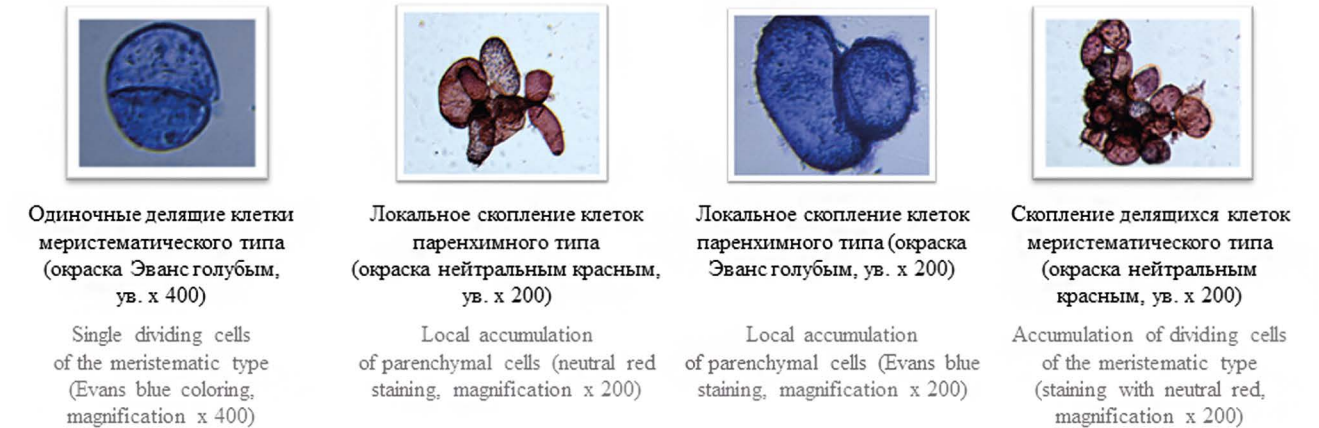


Рисунок 2. Микроскопия клеток культуры шалфея лекарственного

Figure 2. Microscopy of cells of a culture of *Salvia officinalis*

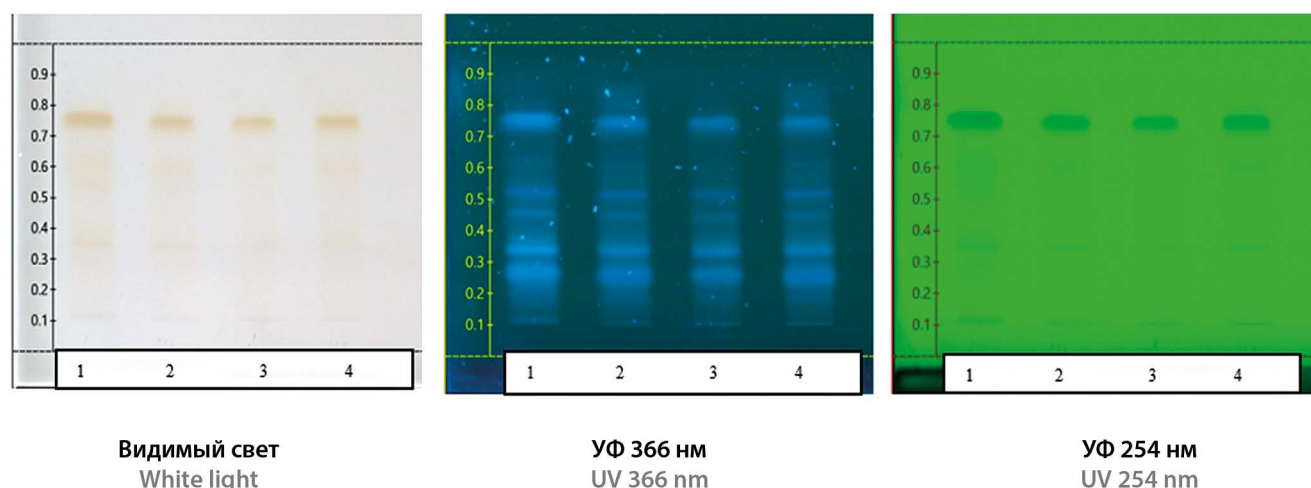


Рисунок 3. Хроматограммы водно-спиртовых вытяжек листьев (1, 2) и биомассы (3, 4) шалфея лекарственного
Figure 3. HPTLC profile of leaves (1, 2) and biomass (3, 4) extracts of *Salvia officinalis* L.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря проведенному исследованию получен жизнеспособный стабильный штамм растительных клеток шалфея лекарственного. Анализ результатов показывает, что для получения первичного каллуса необходимы следующие условия: среда по прописи MS с половинным содержанием микро- и макро-солей и фитогормонами 2,4-Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для следующих пассажей рекомендовано использование питательной среды по прописи MS с полным содержанием микро- и макро-солей и фитогормонами НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Культивирование в темноте, температура 27–28 °С, влажность 60–70 %. Микроскопия показала, что основную массу полученного гетерогенного каллуса составляют клетки меристематического и паренхимного типа. Качественный состав БАВ биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

ЛИТЕРАТУРА

- Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1–18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
- Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences*. 2021;21:68–76. DOI: 10.1002/elsc.202000078.
- Kreis W. Exploiting plant cell culture for natural product formation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2019;92:216–225. DOI: 10.5073/JABFQ.2019.092.030.
- Тихомирова Л. И., Базарнова Н. Г., Ильичева Т. Н., Мартиросян Ю. Ц., Афанасенкова И. В. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris Sibirica* L.) методами биотехнологии. *Химия растительного сырья*. 2018;4:235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
- Meichik N., Nikolaeva Y., Kushunina M. Ion-exchange properties of the cell walls isolated from suspension-cultured plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017;129(3):493–500. DOI: 10.1007/s11240-017-1194-7.
- Chirikova N. K., Olennikov D. N., Grigor'ev R. O. Acylquinic Acids, Flavonoids, and Maltol O-Glucoside from *Panax vietnamensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019;55(6):1161–1163. DOI: 10.1007/s10600-019-02922-1.
- Каухова И. Е., Басевич А. В., Абросимова О. Н., Вайнштейн В. А. Лекарственные средства растительного происхождения. Технология, составы, стандартизация: монография. СПб.: Издательство Кнорус; 2019. 396 с.
- Томилова С. В., Ханды М. Т., Кочкин Д. В., Галишев Б. А., Ключин А. Г., Носов А. М. Влияние синтетических аналогов ауксинов – 2,4-Д и α-НУК – на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. *Физиология растений*. 2020;67(4):389–399. DOI: 10.31857/S001533032004017X.
- Аминова М. З., Кароматов И. Д. Антибактериальные и противовоспалительные свойства лекарственного растения шалфей. *Биология и интегративная медицина*. 2018;10:41–55.
- Алексахина С. А., Макарова Н. В. Сравнительное изучение антиоксидантной активности, фенольных соединений и флавоноидов цветков липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), донника лекарственного (*Mellilotus officinalis* L.), листьев смородины (*Ribes nigrum* folia), земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), винограда (*Vitis labrusca*), произрастающих в самарском регионе. *Химия растительного сырья*. 2019;3:153–159. DOI: 10.14258/jcprm.2019034623.
- Вовк Д. А. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного и изучение её ростовой активности. Молодая фармация – потенциал будущего: сб. статей. 2020:487–490.
- Beckwith A. L., Borenstein J. T., Velásquez-García L. F. Tunable plant-based materials via in vitro cell culture using a *Zinnia elegans* model. *Journal of Cleaner Production*. 2021;125571:288. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125571.
- Бурмистрова Н. А., Красавина М. С., Лунькова Н. Ф., Паничкин Л. А. Использование Эванса голубого и нейтрального красного для оценки жизнеспособности клеток. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2017;3:39–51.
- Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Characteristics of Eliciting Effects of Furostanol Glycosides on Cultured Yam Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(3):427–434. DOI: 10.1134/S1021443718020085.
- Хохлова Е. А. Контроль качества растительных препаратов промышленного и аптечного производства с использованием системы ВЭТСХ. *Фармацевтическая отрасль*. 2016;6(59):82–87.
- Загоскина Н. В. Биотехнология: теория и практика. М.: Издательство Оникс; 2009. 496 с.

REFERENCES

1. Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1–18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
2. Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences*. 2021;21:68–76. DOI: 10.1002/elsc.202000078.
3. Kreis W. Exploiting plant cell culture for natural product formation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2019;92:216–225. DOI: 10.5073/JABFQ.2019.092.030.
4. Tikhomirova L. I., Bazarnova N. G., Ilyicheva T. N., Martirosyan Yu. Ts., Afanasenkova I. V. Obtaining plant raw materials of Siberian iris (*Iris Sibirica* L.) by methods of biotechnology. *Chemistry of plant raw materials*. 2018;4:235–245. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
5. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M. Ion-exchange properties of the cell walls isolated from suspension-cultured plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017;129(3):493–500. DOI: 10.1007/s11240-017-1194-7.
6. Chirikova N. K., Olennikov D. N., Grigor'ev R. O. Acylquinic Acids, Flavonoids, and Maltol O-Glucoside from *Panax vietnamensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019;55(6):1161–1163. DOI: 10.1007/s10600-019-02922-1.
7. Kaukhova I. E., Basevich A. V., Abrosimova O. N., Vainshtain V. A. Herbal medicines. Technology, compositions, standardization: monography. Saint-Petersburg: Knorus publishing; 2019. 396 p. (In Russ.)
8. Tomilova S. V., Khandy M. T., Kochkin D. V., Galishev B. A., Klushin A. G., Nosov A. M. The effect of synthetic analogs of auxins – 2,4-D and α -NAA – on the growth and biosynthetic characteristics of a suspension culture of *Tribulus terrestris* L cells. *Plant physiology*. 2020;67(4):389–399. (In Russ.) DOI: 10.31857/S001533032004017X.
9. Aminova M. Z., Karomatov I. D. Antibacterial and anti-inflammatory properties of the sage medicinal plant. *Biology and Integrative Medicine*. 2018;10:41–55. (In Russ.)
10. Aleksashina S. A., Makarova N. V. Comparative study of antioxidant activity, phenolic compounds and flavonoids of flowers of the linden (*Tilia cordata* Mill.), Medicinal sage (*Salvia officinalis* L.), sweet clover (*Melilotus officinalis* L.), currant leaves (*Ribes nigrum* folia), wild strawberry (*Frangaria vesca* L.), grapes (*Vitis labrusca*) growing in the Samara region. *Chemistry of plant raw materials*. 2019;3:153–159. (In Russ.) DOI:10.14258/jcprm.2019034623.
11. Vovk D. A. Obtaining a callus culture of medicinal sage and studying its growth activity. *Young pharmacy – the potential of the future*. 2020:487–490. (In Russ.)
12. Beckwith A. L., Borenstein J. T., Velásquez-García L. F. Tunable plant-based materials via in vitro cell culture using a *Zinnia elegans* model. *Journal of Cleaner Production*. 2021;125571:288. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125571.
13. Burmistrova N. A., Krasavina M. S., Lunkova N. F., Panichkin L. A. Evans' use of blue and neutral red to assess cell viability. *Izvestiya Timiryazevskoy selskohozyaistvennoy akademii*. 2017;3:39–51. (In Russ.)
14. Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Characteristics of Eliciting Effects of Furostanol Glycosides on Cultured Yam Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(3):427–434. DOI: 10.1134/S1021443718020085.
15. Khokhlova E. A. Quality control of industrial and pharmaceutical herbal preparations using the HPTLC system. *Pharmaceutical industry*. 2016;6(59):82–87. (In Russ.)
16. Zagoskina N. V. Biotechnology: theory and practice. Moscow: Onyx Publishing House; 2009. 496 p. (In Russ.)