

К.В. Листван¹, В.О. Приходько², Н.П. Рибальченко²,
Н.М. Волинець², А.М. Остапчук², М.В. Кучук¹

¹Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна,
тел. +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТА АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН *PSORALEA DRUPACEA* BUNGE

Досліджено антимікробну активність екстрактів культур *Psoralea drupacea* Bunge (псоралеї кістянкової), отриманих в умовах *in vitro*: калюсів сім'ядольного походження та асептичних рослин (надземної частини та коренів). Калюсні культури *P. drupacea* виявляли слабку антимікробну активність або були неактивними. Антимікробну речовину бакуціол в них не виявлено. Показано, що асептичні рослини *P. drupacea* не відрізнялися від рослин, зібраних у природі, за місцем локалізації, спектром, ступенем та характером дії антимікробних речовин. За допомогою ВЕРХ-УФ-аналізу в екстрактах з надземних органів усіх досліджених рослин, вирощених *in vitro*, ідентифіковано меротерпеновий фенол бакуціол, вміст якого в більшості випадків був близьким до його вмісту у рослинах, зібраних у природі.

Ключові слова: *Psoralea drupacea*, бакуціол, антимікробна активність, калюсні культури, асептичні рослини.

Меротерпеновий фенол бакуціол, отриманий з рослин роду *Psoralea* — *P. corylifolia* L. [15] та *P. drupacea* Bunge [2], є однією з найбільш активних антибактеріальних та антигрибкових сполук рослинного походження. Він діє на різні види грампозитивних бактерій та грибів-дерматофітів у концентраціях від 1 до 10, рідше до 20 мкг/мл [5, 4, 13]. Крім того, виявляє противірусні [6] та протипухлинні властивості, протизапальну та антиоксидантну активності тощо [8, 7].

Культури клітин рослин, як і інші типи культур *in vitro* використовуються для прикладних і фундаментальних досліджень в різних галузях біології, а також для розробки біотехнологій отримання ферментів, продуктів вторинного метаболізму та інших біологічно активних речовин рослин і встановлення закономірностей їх біосинтезу. Так, що стосується роду *Psoralea*, встановлено здатність калюсних та інших типів культури *in*



in vitro деяких видів роду продукувати низку біологічно активних речовин: ізофлавоноїди дайдзеїн та геністеїн, фурокумарини псорален та ангеліцин (ізопсорален) тощо [11, 12, 10]. Можливості синтезу антимікробної речовини бакучіолу культурами рослин роду *Psoralea*, отриманими *in vitro*, вперше було досліджено нами [14] на прикладі виду *P. drupacea* (псоралея кістянкова).

Метою даної роботи було вивчення антимікробної активності екстрактів калюсних культур та асептичних рослин *P. drupacea*.

Матеріали і методи

Об'єктами даного дослідження були отримані *in vitro* асептичні рослини (коренева та надземна частини), а також калюсні культури *P. drupacea* сім'ядольного походження, котрі культивувалися на агаризованому середовищі Мурашіге-Скуга, в яке додавали різні за якісним та кількісним складом комбінації фітогормонів (ауксини 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4-Д) та 1-нафтилоцтову кислоту (НОК), цитокініни 6-бензиламінопурин (БАП) та кінетин (К). Частину калюсної біомаси, культивованої на окремих варіантах середовища, додатково культивували у рідкому середовищі в присутності елісатора метилжасмонату (МЖ). Більш детально умови обробки калюсних культур фітогормонами та метилжасмонатом описано раніше [14].

Для дослідження протимікробної активності та кількісного вмісту бакучіолу висушені ліофілізацією калюсні культури та повітряно-сухі надземні та кореневі частини асептичних рослин *P. drupacea* екстрагували хлороформом (деякі калюсні культури — диетиловим ефіром). Для порівняльних досліджень отримували також хлороформні екстракти з повітряно-сухих надземних органів рослин *P. drupacea*, що росли в природних умовах (зібрані в околицях м. Ашгабад у фазі початку цвітіння). Після екстрагування хлороформ відганяли, екстракти розчиняли в етанолі.

Ідентифікацію бакучіолу та його кількісне визначення проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовою детекцією (ВЕРХ-УФ), використовуючи як стандарт бакучіол, отриманий з природної сировини *P. drupacea* за описаним раніше методом [3].

Антимікробну активність екстрактів калюсів та рослин *P. drupacea* досліджували методом серійних розведень на рідких поживних середовищах [1]. Тест-мікроорганізмами були референтні штами бактерій та грибів-дерматофітів, які підтримуються в колекції культур відділу антибіотиків ІМВ НАНУ (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Trichophyton mentagrophytes var. gypsum* K).

Результати та їх обговорення

При дослідженні активності калюсних культур *P. drupacea* як тест-об'єкт був використаний референтний штам *S. aureus* — представник однієї з чутливих до дії бакучіолу груп мікроорганізмів. В таблиці 1



наведено результати випробувань антибактеріальної активності 46 варіантів калюсів сім'ядольного походження *P. drupacea*, культивованих на поживному середовищі з додаванням різних (за якісним та кількісним складом) комбінацій фітогормонів та елісатора метилжасмонату.

Майже у половини з тестованих варіантів калюсних культур *P. drupacea* виявлено невисоку антибактеріальну активність. Екстракти з них пригнічували ріст *S. aureus* в концентраціях 100–400 мкг/мл, у близьких концентраціях діяли бактерицидно. Решта екстрактів була не активною, тобто мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) була більшою за 400 мкг/мл.

Таблиця 1

Антибактеріальна активність щодо *S. aureus* екстрактів калюсних культур *P. drupacea*, культивованих на поживних середовищах різного складу

Table 1

Antimicrobial activity of *P. drupacea* callus cultures extracts obtained on the different media against *S. aureus*

Комбінація фітогормонів у середовищі	МІК калюсних екстрактів, мкг/мл		% активних калюсних екстрактів	
	- мж	+ мж	- мж	+ мж
НОК, БАП	>400	400 – >400	0	66
НОК, К	100 – >400	-	50	-
2,4-Д, К	>400	100	0	100
2,4-Д, БАП	100 – >400	100-200	77	100

Примітки: «2,4-Д» – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота; «НОК» – 1-нафтилоцтова кислота; «БАП» – 6-бензиламінопурин; «К» – кінетин; «- мж» – метилжасмонат при культивуванні не використовувався; «+ мж» – при культивуванні використовувався метилжасмонат; «-» – не вивчали.

Виявлено деяку залежність між якісним фітогормональним складом середовища та антимікробною активністю екстрактів калюсів: серед калюсних культур, вирощених на середовищах з додаванням комбінацій фітогормонів 2,4-Д+БАП та НОК+К, більша частина виявила слабку антимікробну активність. Калюсні культури, вирощені на середовищі з додаванням НОК+БАП та 2,4-Д+К були неактивними. При цьому різниця у кількісному вмісті фітогормонів не відігравала ролі. Після обробки метилжасмонатом майже всі досліджувані калюсні культури набували слабкої антистафілококової активності. Проте ця активність, на нашу думку, не зумовлена наявністю бакучіолу, адже, як встановлено нами раніше, жоден з досліджених варіантів калюсів не містив помітної



кількості цього меротерпену [14]. Можна припустити, що антимікробна активність була зумовлена наявністю в екстрактах інших антимікробних речовин (наприклад, псоралену) — слабоактивних або синтезованих у незначних кількостях.

Антимікробні властивості асептичних рослин *P. drupacea* досліджено щодо представників умовно-патогенних грамположитивних бактерій (*S. aureus*), грамнегативних бактерій (*E. coli*) та грибів-дерматофітів (*T. mentagrophytes var. gypseum*). Досліджували хлороформні екстракти з надземної частини та коренів рослин, культивованих *in vitro*, у порівнянні з екстрактом з надземних органів рослин *P. drupacea*, зібраних у природі, а також з діючою речовиною рослинних екстрактів — меротерпеновим фенолом бакучіолом.

Як видно з наведених у таблиці 2 даних, за місцем локалізації, спектром та ступенем дії антимікробних речовин рослини псоралеї різного походження не відрізнялися. Екстракти з надземних органів як асептичних, так і зібраних у природі рослин, так само як і бакучіол, пригнічували ріст *S. aureus* і *T. mentagrophytes* та не діяли на *E. coli*. В екстрактах з надземних органів усіх досліджених рослин, вирощених *in vitro*, за допомогою ВЕРХ-УФ-аналізу ідентифіковано бакучіол, вміст якого в більшості випадків становив 1,45–3,82% від сухої маси рослини. Повітряно-суха природна сировина *P. drupacea* містила від 3,4 до 4,6% бакучіолу. Тобто, і за цим показником рослини природного і біотехнологічного походження практично не відрізнялися.

Бактерицидну або фунгіцидну дію екстракти з надземних органів рослин, культивованих *in vitro*, так само, як екстракти з природної сировини *P. drupacea* і їх діюча речовина бакучіол, виявляли в концентраціях, близьких до мінімальних інгібуючих концентрацій.

Таблиця 2
Антимікробна активність екстрактів з культивованих *in vitro* та зібраних у природі рослин *P. drupacea*

Table 2
Antimicrobial activity of *P. drupacea* plants extracts cultivated in *in vitro* conditions or collected from nature

Досліджуваний зразок	МІК екстрактів, мкг/мл			Концентрація бакучіолу, %
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. mentagrophytes var. gypseum</i>	
Надземна частина культивованих <i>in vitro</i> рослин	3,3 – 33,3	>400	6,7 – 33,3	0,035 – 3,82
Корені культивованих <i>in vitro</i> рослин	>400	>400	>400	сліди
Надземна частина зібраних у природі рослин	10–20	>400	20	3,4–4,67
Бакучіол	2	>400	4-10	100

Примітка: % — відсоток від сухої маси рослинного матеріалу.



Екстракти з коренів досліджених рослин *P. drupacea* (як вирощених в умовах *in vitro*, так і зібраних у природі) антимікробної дії не виявляли. Як показано нами раніше [14], в коренях асептичних рослин є лише сліди бакучіолу. Це узгоджується з даними про незначні кількості цієї речовини в коренях рослин іншого виду даного роду — *P. corylifolia* (псоралей ліщинолистій) [9]. Крім того, оскільки в культурі «бородатих» коренів *P. drupacea* (ізолювані генетично трансформовані корені) бакучіолу не виявлено взагалі [14], можна припустити, що бакучіол не синтезується в клітинах кореня, а потрапляє туди в слідових кількостях з надземної частини рослини.

Таким чином, проведені дослідження показали, що калюсні культури сім'ядольного походження *P. drupacea* — продуцента вискоєфективного антимікробного меротерпену бакучіолу — значної антимікробної активності не виявляють і бакучіол у помітних кількостях не синтезують. Культура асептичних рослин *P. drupacea*, завдяки високому рівню накопичення бакучіолу в надземних органах, перспективна як джерело високо активного антибіотика і об'єкт для розробки біотехнологічних основ його одержання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Ю., Приходько В.О., Мещеряков А.О., Скоробогатько Т.І., Мішенкова Є.Л. Антибіотичні властивості ефірного масла *Psoralea drupacea* Вге. // Мікробіол. журн. — 1972. — 34, № 5. — С. 612–616.
2. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Е., Бакина Л.А., Кожина И.С., Приходько В.А., Мишенкова Е.Л., Мещеряков А.А. Изучение антимикробной и антивирусной активности эфирного масла из *Psoralea drupacea* Bunge и его компонентов // Растительные ресурсы. — 1974. — 10, № 4. — С. 583–588.
3. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Е., Затула Д.Г., Бакина Л.А., Кожина И.С., Приходько В.А., Силкина О.В., Мещеряков А.А. *Psoralea drupacea* как перспективный источник антибиотика бакучиола // Растительные ресурсы. — 1977. — 13, № 3. — С. 460–463.
4. Данилевский Н.Ф., Смирнов В.В., Приходько В.А., Косович Т.Ю. Чувствительность аэробной микрофлоры ротовой полости к антибиотику бакучиолу // Стоматология: респ. межвед. науч. сб. — Киев: Здоров'я, 1985. — С. 9–12.
5. Приходько В.А., Бондаренко А.С., Мишенкова Е.Л. Антимикробная активность и токсичность антибиотика бакучиола // Микробиол. журн. — 1980. — 42, № 5. — С. 646–650.
6. Приходько В.А., Жмурко Л.И., Бобырь А.Д., Мещеряков А.А. Активность бакучиола в отношении вируса табачной мозаики // Микробиол. журн. — 1982. — 44, № 3. — С. 73–74.



7. Adhikari S., Joshi R., Patro B.S., Ghanty T.K., Chintalwar G.J., Sharma A., Chattopadhyay S., Mukherjee T. Antioxidant activity of bakuchiol: experimental evidence and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain // Chem. Res. Toxicol. — 2003. — 16, № 9. — P. 1062–69.

8. Backhouse C.N., Delporte C.L., Negrete R.E., Erazo S., Zuniga A., Pinto A., Cassels B.K. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with anti-inflammatory and antipyretic activities // J. Ethnopharmacol. — 2001. — 78, № 1. — P. 27–31.

9. Banerji A., Chintalwar G. Biosynthesis of bakuchiol, a meroterpene from *Psoralea corylifolia* // Phytochemistry. — 1983. — 22, № 9. — P. 1945–1947.

10. Baskaran P., Jayabalan N. Psoralen production in hairy roots and adventitious root cultures of *Psoralea corylifolia* // Biotechnol. Lett. — 2009. — 31, № 7. — P. 1073–1077.

11. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1998. — 53, № 1. — P. 35–40.

12. Bourgaud F., Bouque V., Guckert A. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1999. — 56, № 2. — P. 97–104.

13. Katsura H., Tsukiyama R.I., Suzuki A., Kobayashi M. *In vitro* activities of bakuchiol against oral microorganisms // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — 45, № 11. — P. 3009–3013.

14. Lystvan K., Belokurova V., Sheludko Y., Ingham J.L., Prykhodko V., Kishchenko O., Paton E., Kuchuk M. Production of bakuchiol by *in vitro* systems of *Psoralea drupacea* Bge. // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 2010. — 101, № 1. — P. 99–103.

15. Mehta G., Nayak U.R., Dev S. Meroterpenoids. 1. *Psoralea corylifolia* Linn. 1. Bakuchiol, a novel monoterpene phenol // Tetrahedron. — 1973. — 29. — P. 1119–1125.



К.В. Листван¹, В.А. Приходько², Н.П. Рибальченко², Н.М. Волинець²,
А.Н. Остапчук², Н.В. Кучук¹

¹Інститут кліткової біології та генетическої інженерії НАН України, ул. Академіка
Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

²Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України,
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

АНТИМІКРОБНА АКТИВНОСТЬ ЕКСТРАКТОВ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР І АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНЬ *PSORALEA* *DRUPACEA BUNGE*

Реферат

Ісследована антимікробна активність екстрактів культур *Psoralea drupacea* Bunge (псоралеї костянковий), отриманих в умовах *in vitro*: каллюсов семядольного походження і асептичних рослин (надземної частини і коренів). Каллюсні культури *P. drupacea* проявляли слабку антимікробну активність або були неактивними. Антимікробне речовина бакуціол в них виявлено не було. Показано, що асептичні рослини *P. drupacea* не відрізнялися від рослин, зібраних в природі, по місцю локалізації, спектру, ступеню і характеру дії антимікробних речовин. С допомогою ВЭЖХ-УФ аналізу в екстрактах надземних органів всіх досліджуваних рослин, вирощених *in vitro*, ідентифікований меротерпеновий фенол бакуціол, вміст якого в більшості випадків наближався до його вмісту в рослинах, зібраних в природі.

Ключеві слова: *Psoralea drupacea*, бакуціол, антимікробна активність, каллюсні культури, асептичні рослини.



**K.V. Lystvan¹, V.O. Prykhodko², N.P. Rybalchenko², N.M. Volynets²,
A.M. Ostapchuk², M.V. Kuchuk¹**

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, 148, Academ. Zabolotny str.,
Kyiv, 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

²Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ.Zabolotny str.,
Kyiv, 03680, Ukraine

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF CALLUS CULTURES AND ASEPTIC PLANTS OF *PSORALEA DRUPACEA* BUNGE

Summary

Antimicrobial activity has been investigated for *P. drupacea* *in vitro* cultures (cotyledon-derived calli; aerial parts and roots of aseptic plants). Activity of calli was weak or absent. Aseptic *P. drupacea* plants as it is shown have no differences from collected ones in nature in antimicrobial localization, spectrum and degree of influence. By the means of HPLC-UV in the extracts of aerial parts of the investigated plants the meroterpene bakuchiol has been identified. The content of the substance in aseptic plants was similar to the one in the plants collected in nature.

Key words: *Psoralea drupacea*, bakuchiol, antimicrobial activity, callus cultures, aseptic plants.

