

## Введение в культуру *in vitro* *Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771)

В. А. Бессонова<sup>1✉</sup>, О. Е. Черепанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

✉ E-mail: [bessonova-varechka@mail.ru](mailto:bessonova-varechka@mail.ru)

**Аннотация.** Целью данного исследования было введение в культуру *Ginkgo biloba* для изучения состава и свойств его биологически активных соединений. **Методы.** Исследовались оптимальные условия для получения жизнеспособной культуры тканей, такие как концентрация фитогормонов, световой день, концентрация неорганических и органических веществ в составе среды Мурашиге – Скуга. Также была проверена эффективность стандартного метода стерилизации гипохлоридом натрия молодых листьев и вегетативных почек. **В результате** проведенного эксперимента был получен жизнеспособный каллус из листьев *G. biloba*, что свидетельствует об оптимальности подобранных условий, способствующих высокой пролиферативной активности растения. Исследовано влияние фитогормонов ИУК в концентрации 0,5 мл и 6-БАП, в концентрации 2,5 мл. А также был подобран идеальный посадочный материал для получения каллуса – молодые листья, которые оказались чувствительнее к обработке гипохлоридом. **Научная новизна.** Данное исследование является фундаментом для будущих работ как нашей лаборатории, так и других исследовательских групп. Полученный каллус можно использовать для размножения представителей *G. biloba* в условиях оранжерей и дальнейшего исследования уникальных химических веществ, таких как гинкгоглиды и билобалиды, содержащихся в экстракте растений данной группы.

**Ключевые слова:** *Ginkgo biloba*, каллус *Ginkgo biloba*, Egb 761, концентрация фитогормонов, стерилизация *Ginkgo biloba*, гинкгоглиды, регенерация растений, вторичные метаболиты.

**Для цитирования:** Бессонова В. А., Черепанова О. Е. Введение в культуру *in vitro* *Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771) // Аграрный вестник Урала. 2020. № 12 (203). С. 43–49. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-203-12-43-49.

**Дата поступления статьи:** 18.05.2020.

### Постановка проблемы (Introduction)

*Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771) является перспективным объектом для изучения и единственным живым представителем в порядке *Ginkgoales* [1, с.58].

К сожалению, часто есть трудности с культивированием *G. biloba* из-за его эндемичности. Ареал произрастания *G. biloba* – Китай. Он расположен небольшими популяциями в основном в горах Юго-Восточного Китая, где в основном субтропический климат. *G. biloba* не приспособлен к низким температурам и засухе, поэтому субтропический климат со среднегодовой температурой 14 °С и средним увлажнением идеально подходит [2, с. 10–13]. В связи с этим за пределами ареала *G. biloba* культивируют в оранжереях, а также выводят новые устойчивые сорта. Часто не получается создать оптимальные условия, в которых растению будет комфортно расти. Очень сложно подобрать состав почвы, влажность, температуру, освещенность. Поэтому наиболее перспективно создание культуры *G. biloba* в условиях *in vitro*, что позволит быстрее добиться успеха в культивировании, а также изучение компонентного состава экстрактов *G. biloba*.

Семена *G. biloba* обладают коротким периодом схожести и жизнеспособности, требуют особой методики стратификации, с хранением при 4 °С в течение нескольких месяцев [3], [4]. Вырастить каллус из семян достаточно проблематично. Также семена и эмбрионы очень чувствительны к окружающей среде и плохо сохраняются, быстро

высыхая. Поэтому для создания каллуса перспективнее использовать свежий материал (почки, молодые листья).

Вырастить каллус из семян *G. biloba* возможно при улучшении их сохранности при помощи сложных химических веществ или при высаживании свежих семян [4], [5]. В Китае исследовали влияние хитозана и экстракта экзоплевы *G. biloba* на свежие семена. Данные вещества ингибируют грибковую активность, предотвращая гниение и распад семян, уменьшают окислительный стресс [6]. Это поможет в будущем транспортировать семена, не теряя всхожести.

Целью нашей работы было введение в культуру *G. biloba* для получения материала, который возможно использовать в селекции, а также для изучения накопления БАВ.

### Методология и методы исследования (Methods)

Материалом для культивирования стали молодые вегетативные органы *G. biloba*, произрастающего в оранжерейном комплексе Ботанического сада УрО РАН. Раскрывающиеся молодые листья, пазушные и верхушечные почки были собраны нами в период начала вегетационного сезона. Наиболее предпочтительными для эксперимента были верхушечные почки. Дополнительно нами высаживались и черенки зеленых стеблей. После сбора материал хранили при температуре 5 °С.

Листовая пластинка взрослого растения *G. biloba* даже в начале вегетационного периода имеет размеры от 2 до 6 см, поэтому перед посадкой на среду проводили деление листьев на равные части.

Таблица 1  
Состав среды Мурасиге – Скуга  
для культивирования *G. biloba*

Макроэлементы	Количество
$NH_4NO_3$	825 мг
$KNO_3$	950 мг
$CaCl_2$	155 мг
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185 мг
$KH_2PO_4$	85 мг

Микроэлементы	Количество
Fe-хелат	1 мл
Миоинозит	5 мл
Витамины	100 мг
Сахароза	1 мл
Агар	30 г
Вода	8 г
	До 500 мл

Фитогормоны	Количество
ИУК	0,5 мл
6-BAП	2,5 мл

Table 1  
Composition of Murashige and Skoog medium  
for *G. biloba* cultivation

Macroelements	Amount
$NH_4NO_3$	825 mg
$KNO_3$	950 mg
$CaCl_2$	155 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185 mg
$KH_2PO_4$	85 mg

Microelements	Amount
Fe-chelate	1 ml
Myo-inositol	5 ml
Vitamins	100 mg
Sucrose	1 ml
Agar	30 g
Water	8 g
	Less than 500 ml

Phytohormones	Amount
NAA	0,5 ml
6-BAП	2,5 ml

Культивирование производили на среде Мурасиге – Скуга с авторской вариацией, с добавлением фитогормонов (таблица 1) ИУК и 6-БАП. Согласно предварительному литературному поиску, одновременное использование ИУК и 6-БАП дает оптимальные результаты, формируется быстрорастущая культура *G. biloba* [3], [7–10].

Среду готовили согласно протоколу, состав и концентрация гормонов которой указаны в таблице 1. Горячий субстрат в объеме 25 мл разливали в подготовленную чистую посуду, а после закрывали и автоклавировали.

Перед высаживанием материала на среду проводили стерилизацию посадочного материала с вариацией стандартной методики, часто используемой в биотехнологии [11, с. 38]. Верхушечные и пазушные почки, листья и зеленые стебли погружали в воду с моющим средством с аналогичным Tween 20 действующим эффектом, а после промывали под проточной водой. Материал помещали в отдельную посуду так, чтобы в процессе стерилизации все ткани были полностью погружены в раствор. На первом этапе верхушечные и пазушные почки, листья и зеленые стебли помещали в 70-процентный этанол на 15 секунд. Затем переносили в раствор «Белизны» (раствор гипохлорида) в концентрации 3 % на пять минут. На последнем этапе проводили отмывание в течение 15 минут в стерильной воде в трехкратной повторности. Почки и листья высаживались отдельно.

Перед высаживанием почки были очищены от почечных чешуй при помощи иглы и скальпеля, которые предварительно стерилизовались нами. Повторной стерилизации уже очищенных почек не производилось.

Световой день составлял 16 часов, температурный диапазон – 20–25 °С.

### Результаты (Results)

Интерес, проявляемый к данному таксону, связан с перечнем биологически активных компонентов, которые были обнаружены в результате изучения экстрактов *G. bi-*

*loba*. В зависимости от способа выделения экстракта, места произрастания, а также изменения внешних факторов (температуры, влажности субстрата и атмосферного воздуха, уровня освещенности) концентрации биологически активных компонентов могут значительно варьировать. Среди всех биологически активных веществ, доступных к выделению из вегетирующих частей растения, наибольший интерес представляет Egb 761. На сегодняшний день экстракт Egb 761 является наиболее исследованным и допущенным к использованию в качестве медицинского препарата. В нем отмечены уникальные химические соединения, которых нет в других группах растений, гинкгоглиды (3,1 %) и билобалиды (2,9 %) [12–14]. Встречается большое количество терпенов (около 38 %), флавоноидов (до 24 %) и в небольших концентрациях агликаны [3]. Гинкгоглиды и билобалиды достаточно хорошо изучены, известно их строение, основные физические и химические свойства. Проведено множество исследовательских работ, направленных на изучение влияния этих групп соединений на физиологические процессы, протекающие в организме лабораторных животных и человека. В результате этих исследований было установлено, что гинкгоглиды обладают нейропротекторным действием, которое позволит в будущем лечить церебральный атеросклероз, двигательную дисфункцию и расстройство памяти путем направленной дифференцировки стволовых клеток, находящихся в нервной ткани [14–20].

Наиболее активно разнообразные экстракты данной группы растений применяются в китайской народной медицине на протяжении многих сотен лет. Особенно ценны для лечения заболеваний системы органов дыхания: кашля и астмы экстракты, получаемые одновременно из листьев и семян [21–23].

В ходе проведенных первичных экспериментов по подбору компонентного состава среды для культивирования *G. biloba* в условиях *in vitro* нами была получена культура

быстрорастущих каллусных клеток, которую удобно использовать в дальнейшем для размножения интродуцированных в Оранжерейном комплексе Ботанического сада немногочисленных представителей данного таксона, а также для изучения состава биологически активных компонентов в различных вариантах экстрактов. Последующее направленное гормональное индуцирование роста разделенных частей каллуса позволит вывести разнообразные линии *G. biloba*.

Образование каллусных клеток на поверхности эксплантов началось через две недели после посадки. Быстрее всего на гормональную стимуляцию ответили стеблевые части вегетативного побега. Результаты, полученные нами о ходе начала роста эксплантов, соответствуют данным, представленным в более ранней работе Ченга [3]. Рост каллусов на поверхности молодых листьев начинался с запозданием в 5–6 дней и локализовался в черешковой области. Следовательно, ткани собственно молодых листьев *G. biloba* имеют невысокую пролиферативную активность за исключением причерешковой области, что подтверждает результаты, полученные в Таврическом университете [7]. Слабо дифференцированный каллус сформировался в большом объеме в районе черешка, на поверхности питательной среды. Через месяц после посадки были сделаны фотографии (рис. 1). Часть каллуса имела желто-коричневый цвет (рис. 1, А), а другая его часть – светлый желто-зеленый (рис. 1, Б, В). Вероятно, это связано со степенью

освещенности в период активного роста экспланта. Скорее всего, образовавшийся каллус (рис. 1, А) был закрыт от света частью листовой пластинки. Светлый желто-зеленый цвет характерен для нормально развивающегося каллуса, который способен к длительному существованию и быстрому росту [24].

Через 5 недель после появления каллуса произошло отмирание больших участков. Через два месяца после посадки была сделанная вторая серия фотографий (рис. 2). Видно значительное ухудшение состояния каллусной ткани (рис. 2, А, Б). Ее объем увеличился, но часть ткани начала отмирать, что говорит об ухудшении питания, а также может свидетельствовать о снижении качества питательной среды. Для сохранения культуры нами проведена повторная пересадка на свежеприготовленную питательную среду с тем же составом Мурасиге – Скуга. Пока неизвестно, что именно повлияло на отмирание каллуса. Одна из возможных причин – неправильно подобранная концентрация солей, макро- и микроэлементов в среде. В начале роста они стимулировали деление и быстрый рост каллуса, но постепенно могли привести к угнетению из-за изменения соотношения макро- и микроэлементов. Также не стоит забывать про влияние света и температуры, которые играют определяющую роль в развитии растения. Для успешного введения в культуру *in vitro* экспланты необходимо чаще пересаживать на свежую среду, чтобы исключить быстрое отмирание каллусной ткани.



А



Б



В

Рис. 1. Образование каллусной ткани на эксплантах *G. biloba* через месяц после посадки: А (части листа из причерешковой области), Б (листья и части стебля), В (листья)



А



Б



С

Fig. 1 Callus tissue formation on *G. biloba* explants, one month after planting: А (part of the sheet from the pedicellate area), В (leaves and parts of the stem), С (leaves)

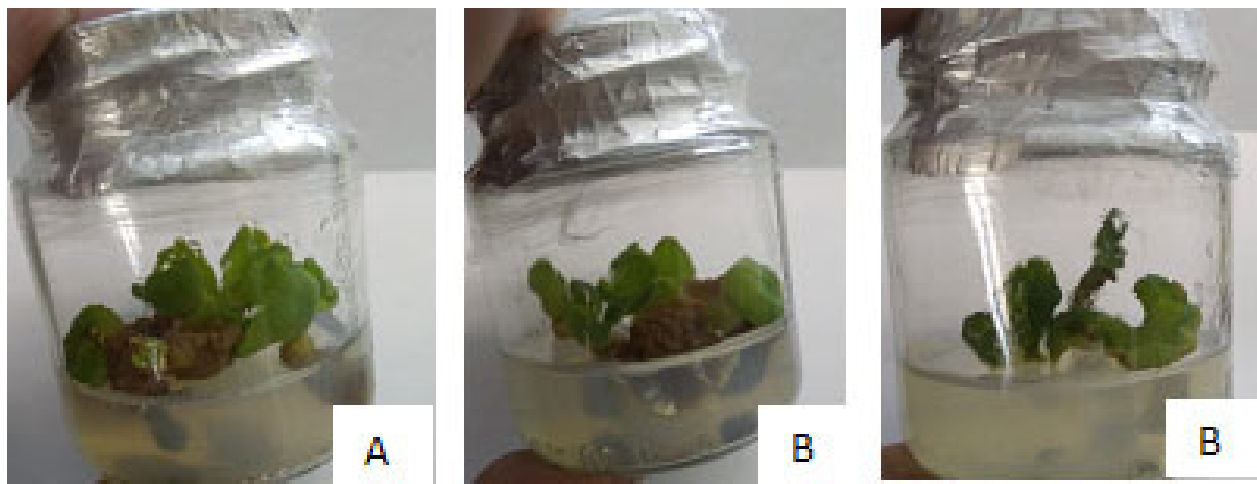


Рис. 2. Культура эксплантов *G. biloba* через два месяца после посадки: А (части листа из причерешковой области), Б (листья и части стебля), В (листья)

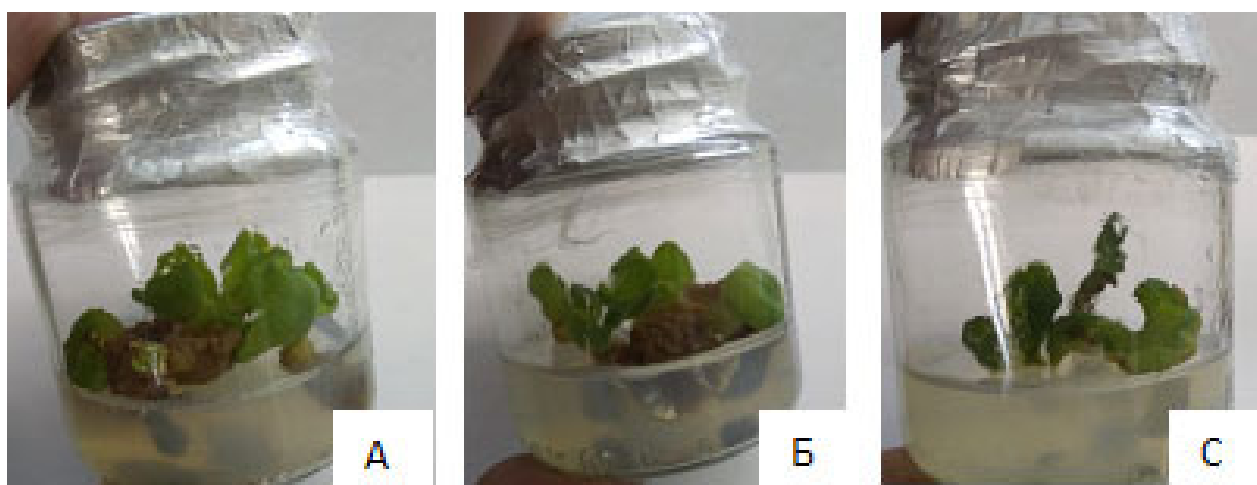


Fig. 2. *G. biloba* explant culture, two months later after planting: A (part of the sheet from the pedicellate area), B (leaves and parts of the stem), C (leaves)

Концентрация фитогормонов в данном варианте среды была подобрана оптимально, что позволило эксплантам успешно развиваться в течение первого месяца. Необходимо отметить, что рост и развитие культуры *G. biloba* идет волнообразно. Периоды активного роста сменяются равными периодами покоя, когда прироста новых тканей не наблюдается. При анализе различных литературных источников нами был определен оптимальный коридор содержания фитогормонов в среде. Концентрация не должна выходить за пределы 0,5–3 мкг для каждого гормона [3], [7], [9], [10]. При концентрации гормонов ниже или выше данного диапазона каллус не образуется либо имеет низкую частоту клеточных делений на первых этапах развития и формирования культуры.

Мы предполагаем, что относительно высокие концентрации гормонов в среде способствовали стагнации ростовых процессов культуры *G. biloba*. Есть вероятность, что данная концентрация оказалась губительна при последующем росте культуры и возможно привела к повышению секреции вторичных метаболитов. В ряде работ отмечено что, концентрация фитогормонов для успешной продукции каллуса и быстрого образования метаболитов, отличается [25], [26].

Часть посаженного материала погибла вследствие заражения патогенной флорой, что явилось результатом некачественной стерилизации посадочного материала. Так как листья были высажены отдельно, они остались здоровы. Именно почки оказались подвержены активному заражению. Использование материала, заимствованного из закрытых оранжерей, не всегда оказывается успешным, так как несет на своей поверхности множество патогенных организмов, часть из которых может погибнуть при стерилизации, а часть сохранить свою активность (например, вирусы). Работа с апикальными точками роста отличается более кропотливым подходом. Нами будет продолжена работа по подбору материалов для стерилизации. Так как после очищения от почечных чешуй сами зародышевые листья мы не обрабатывали, возможно, и этот факт оказал неблагоприятный эффект. К сожалению, обработать зародышевые листья, не повредив их, очень сложно.

Поэтому в дальнейших исследованиях мы будем использовать для создания каллуса молодые листья *G. biloba*.

#### Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Согласно полученным данным, наиболее перспективными для размножения можно считать причерешковые

области листовой пластинки, где формирование каллусной ткани начинается уже со второй недели экспозиции эксплантов на питательной среде. Сформированный каллус слабо окрашен и не дифференцирован. Наиболее подходящие каллусы для изучения компонентного состава формируются из тканей молодых листьев с запозданием, в среднем на пять дней. Каллус более плотный насыщенного зеленого цвета.

Формирование коллекции из представителей редких растений, например, *G. biloba*, произрастающих не только на территории Среднего Урала и России, выступающих в качестве ценного фармакологического материала, играет важную роль как для развития соответствующих научных направлений, так и для ряда промышленных отраслей.

#### Благодарности (Acknowledgements)

Коллектив авторов благодарит коллег из Оранжерейного комплекса Ботанического сада УрО РАН за предоставление материала.

#### Библиографический список

- Christenhusz M., Reveal J., Farjon A., Gardner M. F., Mill R. R., Chase M. W. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms // *Phytotaxa*. 2011. Vol. 19. Pp. 55–70. DOI: 10.11646/phytotaxa.19.1.3.
- Golovneva L. B. Morphology and epidermal characters of *Ginkgo pilifera* Samyl. leaves and distribution of this species in the Late Cretaceous of Northern Asia // *Palaeobotany*. 2016. Vol. 7. Pp. 5–37. DOI: 10.31111/palaeobotany/2016.7.5.
- Cheng S., Zhang W., Sun N., Xu F., Li L., Liao Y., Cheng H. Production of Flavonoids and Terpene Lactones from Optimized *Ginkgo biloba*, Tissue Culture // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2014. Vol. 42. No. 1. Pp. 88–93. DOI: 10.15835/nbha4219393.
- Šmarda P., Horová L., Knápek O., et al. Multiple haploids, triploids, and tetraploids found in modern-day “living fossil” *Ginkgo biloba* // *Horticulture Research*. 2018. Vol. 5. Article number: 55. DOI: 10.1038/s41438-018-0055-9.
- Feng J., Shen Y., Shi F., Li C. Embryo Development, Seed Germination, and the Kind of Dormancy of *Ginkgo biloba* L. // *Forests*. 2018. Vol. 9. Article number: 700. DOI: 10.3390/f9110700.
- Tian F., Chen W., Fan G., Li T., Wu C., Kou X., Wu Z. Effect of *Ginkgo biloba* seed exopleura extract and chitosan coating on the postharvest quality of *Ginkgo* seed // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018. Vol. 99. Pp. 3124–3133. DOI: 10.1002/jsfa.9527.
- Теплицкая Л. М., Чмелева С. И., Бугара И. А., Бугара А. М. Особенности каллусогенеза в культуре вегетативных органов *Ginkgo biloba* L. // *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. 2010. Вып. 101. С. 65–69
- Sukito A., Tachibana S., Itoh K. Callus Induction and Production of Bilobalide and Ginkgolides by Callus and Cell Suspension Cultures of *Ginkgo biloba* Leaves // *International Journal Sustainable Future for Human Security J-Sustain N*. 2016. Vol. 4. No. 1. Pp. 17–22. DOI: 10.24910/jsustain/4.1/1722.
- Bekhit M., Gomaa E., Ibrahim I., Nasr M. In vitro Studies on *Ginkgo biloba* L. 2-Factors affecting callus production and ginkgolide contents // *Journal of Productivity and Development*. 2008. Vol. 13. Pp. 457–478.
- Jeon M., Sung S., Jeon S., Huh H., Kim J., Kim Y. Cultures of *Ginkgo biloba* effect of nutritional and hormonal factors on the growth of cultured cells derived from *Ginkgo biloba* // *Archives of Pharmacal Research*. (1993). Vol. 16. Pp. 244–250. DOI: 10.1007/BF02974490.
- Misra A. N., Misra M. Sterilisation techniques in plant tissue culture. // In book: *Plant Tissue culture: totipotency to transgenic*. Chapter 3. Ranchi, India: Agrobios, 2012. Pp. 31–42. DOI: 10.13140/2.1.1622.5281.
- Sati P., Dhyani P., Bhatt I., Pandey A. *Ginkgo biloba* flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method // *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2018. Vol. 9. Iss. 1. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.10.003.
- Nakanishi K., Habaguchi K. Biosynthesis of ginkgolide B, its diterpenoid nature, and origin of the tert-butyl group // *Journal of the American Chemical Society*. 1971. Vol. 93 (14). Pp. 3546–3547. DOI: 10.1021/ja00743a052.
- Isah T. Rethinking *Ginkgo biloba* L.: Medicinal uses and conservation // *Pharmacognosy Reviews*. 2015. Vol. 9. P. 140. DOI: 10.4103/0973-7847.162137.
- Wang H., Wu X., Lezmi S., Li Q., Helferich W., Xu Y. Extract of *Ginkgo biloba* exacerbates liver metastasis in a mouse colon cancer Xenograft model // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017. Vol. 17(1). Article number: 516. DOI: 10.1186/s12906-017-2014-7.
- Guzel N., Sayit E., Aynaci O., Kerimoglu S., Yulug E., Topbas M. *Ginkgo Biloba* improves bone formation during fracture healing: an experimental study in rats // *Acta Orthopédica Brasileira*. 2017. Vol. 25. Pp. 95–98. DOI: 10.1590/1413-785220172503156966.
- Tian J., Shi J., Wei M., Ni J., Fang Z., Gao J., Wang H., Yao H., Zhang J., Li J., Min M., Su L., Sun X., Wang B., Wang B., Yang F., Zou Y., Hu Y., Lin Y., Wang Y. Chinese herbal medicine Qinggongshoutao for the treatment of amnesic mild cognitive impairment: A 52-week randomized controlled trial // *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2019. Vol. 5. Pp. 441–449. DOI: 10.1016/j.trci.2019.03.001.
- Jian G., Mingyang K., Yingying H., Tuo Z., Hui J., Chunyang K. Ginkgolides B alleviates hypoxia-induced PC-12 cell injury by up-regulation of PLK1 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019. Vol. 115. P. 108885. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108885.
- Zhao-Ma Shu, Xiao-Dong Shu, Hui-Qin Li, Yi Sun, Han Shan, Xi-Yang Sun, Ren-Hong Du, Ming Lu, Ming Xiao, Jian-Hua Ding, Gang Hu, Ginkgolide B protects against ischemic stroke via modulating microglia polarization in mice, *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2016 Sep; 22(9): 729–739. DOI: 10.1111/cns.12577.
- DeFeudis F., Drieu K. *Ginkgo Biloba* Extract (EGb 761) and CNS Functions: Basic Studies and Clinical Applications // *Current drug targets*. 2000. Vol. 1. Pp. 25–58. DOI: 10.2174/1389450003349380.

21. Hatano K., Miyakawa T., Sawano Y., Tanokura M., Victor R., Reedy V. R., et al. Antifungal and lipid transfer proteins from Ginkgo (*Ginkgo biloba*) Seeds // In: Reedy V. R., Watson R. R., Patel V. B., editors. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. United Kingdom: Elsevier Inc., 2011. Pp. 528–534. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10063-5.
22. Van Beek, Teris Montoro, Paola. (2009). Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of chromatography. A*. 2009 Mar 13;1216(11):2002-32. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.013.
23. Zhou M., Hua T., Ma X., Xu L. Protein content and amino acids profile in 10 cultivars of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) nut from China // *Royal Society Open Science*. 2019. Vol. 6. P. 181571. DOI: 10.1098/rsos.181571.
24. Carrier D. J., Cosentino G., Neufeld R., Rho D., Weber M., Archambault J. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture // *Plant Cell Reports*. 1990. Vol. 8 (11). Pp. 635–638. DOI: 10.1007/BF00269981.
25. Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // *Engineering*. 2018. Vol. 5. Iss. 1. DOI: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
26. Alamgir A. N. M. Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention) // *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts*. 2018. Vol. 74. Pp. 585–664. DOI: 10.1007/978-3-319-92387-1\_7.

**Об авторах:**

Варвара Александровна Бессонова<sup>1</sup>, старший инженер лаборатории популяционной биологии древесных растений и динамики леса, ORCID 0000-0002-9433-169X, AuthorID 1079770; +7 922 144-53-29, [bessonova-varechka@mail.ru](mailto:bessonova-varechka@mail.ru)  
 Ольга Евгеньевна Черепанова<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной биологии древесных растений и динамики леса, ORCID 0000-0001-7775-6488, AuthorID 736817; [botgarden.olga@gmail.com](mailto:botgarden.olga@gmail.com)

<sup>1</sup> Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

## Introduction to in vitro culture of *Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771)

V. A. Bessonova<sup>1</sup>✉, O. E. Cherepanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Botanical Garden of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

✉ E-mail: [bessonova-varechka@mail.ru](mailto:bessonova-varechka@mail.ru)

**Abstract.** The purpose of this research was to introduce *Ginkgo biloba* into culture, to study the composition and properties of its biologically active compounds. **Methods.** We researched the optimal growth conditions for obtaining a viable tissue culture, such as: concentration of phytohormones and other organic and nonorganic substances in Murashige – Skoog medium and light hours. The effectiveness of the standard method of sodium hypochloride sterilization of young leaves and vegetative buds also was verified. **As a result,** of conducting the experiment we were able to grow a living callus from leaves of *G. biloba*. Based on this result we can conclude that these conditions are acceptable for high proliferative activity of the plant. We were studied the effect of phytohormones NAA, at a concentration of 0.5 ml and 6-BAP, at a concentration of 2.5 ml. Also, was selected the ideal planting material for callus production – young leaves that were more sensitive to treatment with hypochloride. This research serves as the foundation for future research not only for our laboratory, but also for other research groups. **Scientific novelty.** The callus can be used to clone specimens of *G. biloba* in greenhouses. It will be used to extract and study unique chemical compounds, such as ginkgolides, bilobalides and various terpenes, contained in the extract of plants of this group.

**Keywords:** *Ginkgo biloba*, callus *Ginkgo biloba*, concentration of phytohormones, sterilization of *Ginkgo biloba*, Egb 761, ginkgolides, plant regeneration, secondary metabolites.

**For citation:** Bessonova V. A., Cherepanova O. E. Vvedenie v kul'turu in vitro *Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771) [Introduction to in vitro culture of *Ginkgo biloba* (Linnaeus, 1771)] // *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2020. No. 12 (203). Pp. 43–49. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-203-12-43-49. (In Russian.)

**Paper submitted:** 18.05.2020.

### References

1. Christenhusz M., Reveal J., Farjon A., Gardner M. F., Mill R. R., Chase M. W. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms // *Phytotaxa*. 2011. Vol. 19. Pp. 55–70. DOI: 10.11646/phytotaxa.19.1.3.
2. Golovneva L. B. Morphology and epidermal characters of *Ginkgo piliifera* Samyl. leaves and distribution of this species in the Late Cretaceous of Northern Asia // *Palaeobotany*. 2016. Vol. 7. Pp. 5–37. DOI: 10.31111/palaeobotany/2016.7.5.
3. Cheng S., Zhang W., Sun N., Xu F., Li L., Liao Y., Cheng H. Production of Flavonoids and Terpene Lactones from Optimized *Ginkgo biloba*, Tissue Culture // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2014. Vol. 42. No. 1. Pp. 88–93. DOI: 10.15835/nbha4219393.
4. Šmarda P., Horová L., Knápek O., et al. Multiple haploids, triploids, and tetraploids found in modern-day “living fossil” *Ginkgo biloba* // *Horticulture Research*. 2018. Vol. 5. Article number: 55. DOI: 10.1038/s41438-018-0055-9.

5. Feng J., Shen Y., Shi F., Li C. Embryo Development, Seed Germination, and the Kind of Dormancy of Ginkgo biloba L. // *Forests*. 2018. Vol. 9. Article number: 700. DOI: 10.3390/f9110700.
6. Tian F., Chen W., Fan G., Li T., Wu C., Kou X., Wu Z. Effect of Ginkgo biloba seed exopleura extract and chitosan coating on the postharvest quality of Ginkgo seed // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018. Vol. 99. Pp. 3124-3133. DOI: 10.1002/jsfa.9527.
7. Teplitskaya L. M., Chmeleva S. I., Bugara I. A., Bugara A. M. Osobennosti kallusogeneza v kul'ture vegetativnykh organov Ginkgo biloba L. [Features of callusogenesis in the culture of vegetative organs of Ginkgo biloba] // *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2010. Vol. 101. Pp. 65–69. (In Russian.)
8. Sukito A., Tachibana S., Itoh K. Callus Induction and Production of Bilobalide and Ginkgolides by Callus and Cell Suspension Cultures of Ginkgo biloba Leaves // *International Journal Sustainable Future for Human Security J-Sustain N*. 2016. Vol. 4. No. 1. Pp. 17–22. DOI: 10.24910/jsustain/4.1/1722.
9. Bekhit M., Gomaa E., Ibrahim I., Nasr M. In vitro Studies on Ginkgo biloba L. 2-Factors affecting callus production and ginkgolide contents // *Journal of Productivity and Development*. 2008. Vol. 13. Pp. 457–478.
10. Jeon M., Sung S., Jeon S., Huh H., Kim J., Kim Y. Cultures of Ginkgo biloba effect of nutritional and hormonal factors on the growth of cultured cells derived from Ginkgo biloba // *Archives of Pharmacal Research*. (1993). Vol. 16. Pp. 244–250. DOI: 10.1007/BF02974490.
11. Misra A. N., Misra M. Sterilisation techniques in plant tissue culture. // In book: *Plant Tissue culture: totipotency to transgenic*. Chapter 3. Ranchi, India: Agrobios, 2012. Pp. 31–42. DOI: 10.13140/2.1.1622.5281.
12. Sati P., Dhyani P., Bhatt I., Pandey A. Ginkgo biloba flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method // *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2018. Vol. 9. Iss. 1. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.10.003.
13. Nakanishi K., Habaguchi K. Biosynthesis of ginkgolide B, its diterpenoid nature, and origin of the tert-butyl group // *Journal of the American Chemical Society*. 1971. Vol. 93 (14). Pp. 3546–3547. DOI: 10.1021/ja00743a052.
14. Isah T. Rethinking Ginkgo biloba L.: Medicinal uses and conservation // *Pharmacognosy Reviews*. 2015. Vol. 9. P. 140. DOI: 10.4103/0973-7847.162137.
15. Wang H., Wu X., Lezmi S., Li Q., Helferich W., Xu Y. Extract of Ginkgo biloba exacerbates liver metastasis in a mouse colon cancer Xenograft model // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017. Vol. 17(1). Article number: 516. DOI: 10.1186/s12906-017-2014-7.
16. Guzel N., Sayit E., Aynaci O., Kerimoglu S., Yulug E., Topbas M. Ginkgo Biloba improves bone formation during fracture healing: an experimental study in rats // *Acta Ortopedica Brasileira*. 2017. Vol. 25. Pp. 95–98. DOI: 10.1590/1413-785220172503156966.
17. Tian J., Shi J., Wei M., Ni J., Fang Z., Gao J., Wang H., Yao H., Zhang J., Li J., Min M., Su L., Sun X., Wang B., Wang B., Yang F., Zou Y., Hu Y., Lin Y., Wang Y. Chinese herbal medicine Qinggongshoutao for the treatment of amnesic mild cognitive impairment: A 52-week randomized controlled trial // *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2019. Vol. 5. Pp. 441–449. DOI: 10.1016/j.trci.2019.03.001.
18. Jian G., Mingyang K., Yingying H., Tuo Z., Hui J., Chunyang K. Ginkgolides B alleviates hypoxia-induced PC-12 cell injury by up-regulation of PLK1 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019. Vol. 115. P. 108885. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108885.
19. Zhao-Ma Shu, Xiao-Dong Shu, Hui-Qin Li, Yi Sun, Han Shan, Xi-Yang Sun, Ren-Hong Du, Ming Lu, Ming Xiao, Jian-Hua Ding, Gang Hu, Ginkgolide B protects against ischemic stroke via modulating microglia polarization in mice, *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2016 Sep; 22(9): 729–739. DOI: 10.1111/cns.12577.
20. DeFeudis F., Drieu K. Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) and CNS Functions: Basic Studies and Clinical Applications // *Current drug targets*. 2000. Vol. 1. Pp. 25–58. DOI: 10.2174/1389450003349380.
21. Hatano K., Miyakawa T., Sawano Y., Tanokura M., Victor R., Reedy V. R., et al. Antifungal and lipid transfer proteins from Ginkgo (Ginkgo biloba) Seeds // In: Reedy V. R., Watson R. R., Patel V. B., editors. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. United Kingdom: Elsevier Inc., 2011. Pp. 528–534. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10063-5.
22. Van Beek, Teris Montoro, Paola. (2009). Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of chromatography. A*. 2009 Mar 13;1216(11):2002-32. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.013.
23. Zhou M., Hua T., Ma X., Xu L. Protein content and amino acids profile in 10 cultivars of ginkgo (Ginkgo biloba L.) nut from China // *Royal Society Open Science*. 2019. Vol. 6. P. 181571. DOI: 10.1098/rsos.181571.
24. Carrier D. J., Cosentino G., Neufeld R., Rho D., Weber M., Archambault J. Nutritional and hormonal requirements of Ginkgo biloba embryo-derived callus and suspension cell culture // *Plant Cell Reports*. 1990. Vol. 8 (11). Pp. 635–638. DOI: 10.1007/BF00269981.
25. Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // *Engineering*. 2018. Vol. 5. Iss. 1. DOI: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
26. Alamgir A. N. M. Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention) // *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts*. 2018. Vol. 74. Pp. 585–664. DOI: 10.1007/978-3-319-92387-1\_7.

#### Authors' information:

Varvara A. Bessonova<sup>1</sup>, senior engineer of the laboratory of population biology of woody plants and forest dynamics, ORCID 0000-0002-9433-169X, AuthorID 1079770; +7 922 144-53-29, [bessonova-varechka@mail.ru](mailto:bessonova-varechka@mail.ru)

Olga E. Cherepanova<sup>1</sup>, candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of population biology of woody plants and forest dynamics, ORCID 0000-0001-7775-6488, AuthorID 736817; [botgarden.olga@gmail.com](mailto:botgarden.olga@gmail.com)

<sup>1</sup> Botanical Garden of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia