
БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 581.14

**В.Ю. Дорофеев, Р.А. Карначук, С.В. Пулькина,
Е.В. Комлева, В.Б. Дубина, Ю.В. Медведева**

*Биологический институт Томского государственного университета
(г. Томск)*

**КУЛЬТУРА КНЯЖИКА СИБИРСКОГО (*ATRAGENE SPECIOSA*
WEINM.) *IN VITRO*: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
И ОБРАЗОВАНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ
И ФЛАВОНОИДОВ**

Работа поддержана грантом ФЦНТП (Государственный контракт
№ 02.512.11.2220 от 4 июля 2008 г.).

Аннотация. Получена клеточная культура *Atragene speciosa* Weinm. *in vitro*. В культуре каллусных клеток *in vitro* показано образование физиологически активных веществ, в том числе флавоноидов и сапонинов. Впервые проведены цитогенетические исследования по изучению генетической изменчивости клеток в каллусе княжика сибирского: обнаружена генетическая нестабильность каллусной культуры и выделено несколько цитотипов по числу и структуре хромосом. Для клеток меристематического типа каллусной культуры показана изменчивость в числе хромосом.

Ключевые слова: *Atragene speciosa* Weinm.; клеточная культура; *in vitro*; тритерпеновые гликозиды; сапонины; флавоноиды; полиплоидия; анеуплоидия; структурные перестройки хромосом.

В народной медицине Востока издавна для лечения широкого спектра заболеваний используется княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) [1]. Современные исследования показали ноотропное, адаптогенное и антиоксидантное действие этого растения [2]. Основными группами веществ княжика сибирского, отвечающими за фармакологическую активность, являются тритерпеновые гликозиды, флавоноиды и производные фенилэтанола [3, 4]. Как показали исследования препаратов с ноотропным действием, полученных из растений, они по своей активности превосходят такой препарат ноотропного ряда, как пирацетам. При этом практически отсутствуют побочные эффекты, а стоимость растительных препаратов такого класса намного ниже синтетических.

Однако препятствием для разработки лекарственных растительных препаратов являются ограниченность или отсутствие запасов сырья, связанные с особенностями биологии вида. *Atragene speciosa* Weinm. – лиана, и в силу такой специфики затруднена ее интродукция. Остается возможность введения княжика сибирского в культуру клеток *in vitro*, что позволяет получать

экологически чистое сырье круглогодично, независимо от климатических условий. В настоящее время для некоторых видов созданы клеточные культуры *in vitro*, способные к синтезу вторичных соединений, продуцентами которых являются целые растения [5, 6].

Объект и методики исследования

Объектом исследования явилась каллусная культура клеток княжика сибирского, полученная от разных эксплантов интактных растений, растущих в окрестностях Степановки (г. Томск). Получение и культивирование каллуса проводили на оптимизированных питательных средах Мурасиге-Скуга с добавлением гормонов 2,4-Д (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК (α -нафтилуксусная кислота) и БАП (6-бензиламинопурин) в разной концентрации. Выращивание проводили в темноте с продолжительностью субкультивирования 30–40 сут.

В культурах каллуса с 5-го по 10-й пассаж и 70-го пассажа анализировали накопление тритерпеновых гликозидов (сапонины) и флавоноидов спектрофотометрическим методом. Метод определения количественного содержания флавоноидов основан на процессе комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия (III). Использовали 200–300 мг сухой массы клеток каллуса. Экстракцию проводили трижды 50% этиловым спиртом на водяной бане в течение 30 мин. Далее проводили спектрофотометрическое измерение суммы флавоноидов [7]. Для количественного определения сапонинов использовали 1 г сухой массы каллусных клеток. Экстрагировали трижды горячим ацетоном. Измеряли оптическую плотность водного раствора осажденных аммиаком сапонинов на спектрофотометре СФ-46.

Каллусная культура 10-го пассажа княжика сибирского *in vitro* была проанализирована на цитогенетическую стабильность. Определение митотической активности каллуса проводили с помощью темпоральной фиксации по одному образцу каллусной культуры с 9 до 18 ч в спирт-уксусной смеси в течение 6 ч. Для цитогенетического анализа 31 образец каллусной культуры 10-го пассажа фиксировали в спирт-уксусной смеси (3:1) в течение 6 ч с предварительной обработкой в 0,1% р-ре колхицина в течение 3 ч. Материал хранился в 80% спирте при температуре +4°C. Окрашивание проводили ацетогематоксилином по Смирнову [8]. Анализ стадий клеточного цикла и числа хромосом проведен на временных давленных препаратах. В исследовании использованы клетки меристематического типа [9].

Результаты и обсуждение

В лабораторных экспериментах было получено от разных эксплантов несколько линий клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. При длительном культивировании в клеточной культуре княжика сибирского на твердой среде образуются физиологически активные вещества, в том числе тритерпеновые гликозиды и флавоноиды (табл. 1). Их уровень растет, достигая 80% содержания сапонинов по отношению к листьям целого растения. Содержание флавоноидов в клетках 70-го пассажа составило около 40% также в срав-

нении с листьями интактного растения. Возможно, изменение уровня сапонинов и флавоноидов является результатом генетической изменчивости в культуре *in vitro*, в основе которой лежит изменение ploидности [10].

В литературе имеются сведения о кариотипе дикорастущего княжика сибирского [11–13]. В изученных природных популяциях Восточной и Западной Сибири, Тувы и Северо-Востока европейской части СССР, по литературным данным, вид представлен растениями с диплоидным числом хромосом $2n = 16$. В кариотипе выявлены метацентрические и субметацентрические хромосомы и одна пара акроцентрических хромосом. Для растений популяции в окрестности г. Томска в кариотипе отмечены две пары спутничных хромосом (субакроцентрическая и акроцентрическая пары) [13].

Авторами впервые проведены цитогенетические исследования по изучению генетической изменчивости клеток каллуса княжика сибирского. Известно, что при введении в клеточную культуру растительные клетки теряют генетическую стабильность и наблюдается формирование высокого уровня полиплоидии и анеуплоидии [14]. Одним из важных факторов, нарушающих генетическую стабильность в культуре клеток, являются гормоны питательной среды [15]. Значительную роль играет видовая специфика [16]. Некоторые виды сохраняют стабильность морфологии хромосом при длительном культивировании каллуса [17].

Для клеток меристематического типа каллусной культуры показана изменчивость в числе хромосом, которая проявилась в наличии клеток с диплоидным числом хромосом ($2n = 16$), полиплоидией, анеуплоидией и структурными перестройками хромосом (табл. 2). Клетки округлые с одним крупным ядром, занимающим $1/3$ площади клетки. Показано, что максимум митотической активности приходился на 12–14 ч и составил в среднем около 4%.

В клетках 10-го пассажа преобладающими оказались тетраплоидные клетки (29,6%), частота клеток с исходным диплоидным числом хромосом и триплоидией составила 22,9 и 21,9% соответственно. В небольшом проценте клеток отмечаются пента-, гекса-, гепта-, окта- и новемхромосомные числа (от 1,0 до 4,4%). В этой группе наибольший процент составили клетки с гексаплоидным числом хромосом (табл. 2). Анеуплоидия обнаружена в 10,8% клеток, в основном встречается гипердиплоидия. Клетки со структурными перестройками хромосом отмечены в 3,1%. Наблюдалось преобладание гипертетраплоидных клеток с ацентрическими фрагментами, а гипо- и гипердиплоидия с дицентрическими хромосомами, гипертрететраплоидия с мини-хромосомами встречались очень редко (табл. 2).

В результате исследований установлено, что по числу хромосом в клетке можно выделить несколько типов каллусов:

– I тип – полиплоидные и диплоидные клетки (48,4%): 1-й цитотип – $4x = 32$; 2-й цитотип – $3x = 24$; 3-й цитотип – $2n = 16$;

– II тип – диплоидные, полиплоидные и анеуплоидные клетки (32,3%): 1-й цитотип – $4x = 32$; A (анеуплоидия); 2-й цитотип – $3x = 24$; A; 3-й цитотип – $2n = 16$; $3x = 24$; A; 4-й цитотип – $2n = 16$; $4x = 32$; A; 5-й цитотип – $2n = 16$;

– III тип – диплоидные, полиплоидные, анеуплоидные и анеуплоидные со структурными перестройками (19,3%).

Таблица 1

Содержание биологически активных веществ в каллусной культуре
Atragene speciosa Weinm.

№ пассажа	Биологически активные вещества, %	
	Сапонины	Флавоноиды
5	0,050 ± 0,002	Следы
6	0,060 ± 0,008	Следы
7	0,040 ± 0,005	0,040 ± 0,020
8	0,026 ± 0,005	0,070 ± 0,030
9	0,030 ± 0,004	0,090 ± 0,030
10	0,040 ± 0,004	0,070 ± 0,040
70 (20 сут)	0,100 ± 0,010	0,100 ± 0,050
70 (40 сут)	0,145 ± 0,016	0,178 ± 0,038

Примечание. Данные в таблице представлены в виде средней арифметической с ошибкой.

Таблица 2

Числа хромосом и aberrации хромосом в каллусной культуре
княжика сибирского 10-го пассажа

Число образцов каллусной культуры	Число клеток	Частота клеток с разным числом хромосом, %											
		2n	3x	4x	5x	6x	7x	8x	9x	Анеуплоидия	Анеуплоидия и структурные aberrации		
		16	24	32	40	48	56	64	72		Ацентрический фрагмент	Дисцентрик	Мини-хромосома
31	389	22,9	21,9	29,6	1,3	4,4	3,6	1,5	1,0	10,8	1,5	0,8	0,8

В III типе каллусных культур преобладали цитотипы $4x = 32$; А; ацентрические фрагменты. Единично отмечались цитотипы $4x = 32$; А; ацентрические фрагменты и дисцентрические хромосомы, а также цитотипы $4x = 32$; А; ацентрические фрагменты, дисцентрические и мини-хромосомы.

Таким образом, цитогенетический анализ клеток каллусной культуры 10-го пассажа княжика сибирского показал, что разные цитогенетические аномалии генерируются в новый уровень пloidности и новые числа хромосом. Полиплоидия может являться значительным резервом изменчивости, которая реализуется в формировании стабильных каллусов разной пloidности, что является одним из способов промышленного получения клеточной культуры и ее вторичных метаболитов.

Литература

1. Бокова В.С., Краснов Е.А. К фитохимическому и фармакологическому исследованию княжика сибирского // Тезисы докладов межвузовской конференции «Изучение препаратов растительного и синтетического происхождения». Томск. 1978. Ч. 2. С. 14–16.
2. Шилова И.В., Краснов Е.А., Андреева Т.И. и др. Исследование химического состава надземных частей *Atragene sibirica* L. и ее культуры ткани // Материалы Всероссийского совещания. Томск: Изд-во ТГУ, 1998. С. 79–81.

3. Карначук Р.А., Клепикова Т.В., Шилова И.В. и др. Культура ткани *Atragene sibirica* L. – продуцент биологически активных сапонинов // Материалы Международного совещания. Новосибирск, 1998. С. 29.
4. Карначук Р.А., Краснов Е.А., Дорофеев В.Ю., Шилова И.В. Клеточная культура княжика сибирского – перспективный источник лекарственных средств // Материалы Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий». Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2001. С. 182–183.
5. Shoyama Y., Nishioka I., Hatanoto K. IV. Aconitum spp. (Monkshood) // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. With 208 Figures. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1991. P. 68–73.
6. Schmauder H.-P., Doebel P. XIX Nigella spp.: *in vitro* culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. With 208 Figures. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1991. P. 311–336.
7. Минаева В.Г. Лекарственные растения Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1992. 231 с.
8. Пухальский И.А. и др. Практикум по цитологии и цитогенетике растений. М.: КолосС, 2007. 198 с.
9. Кунах В.А. Цитогенетическая разнокачественность штаммов листового и стеблевого происхождения культуры тканей *Harporappus gracilis* (Nutt.) Gray // Цитология и генетика. 1971. Т. V, № 3. С. 241–249.
10. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Адонин В.И., Губарь С.И. Продуктивность и генетическая структура клеточных популяций женьшеня *Panax ginseng* С.А. Меу в культуре *in vitro* // Биотехнология. 2003. № 3. С. 25–35.
11. Ростовцева Т.С. Числа хромосом некоторых видов семейства *Ranunculaceae* Juss. // Ботанический журнал. 1976. Т. 61. С. 1133–1137.
12. Беляев В.А., Сипливинский В.Н. Хромосомные числа некоторых видов Байкальской флоры // Ботанический журнал. 1977. Т. 62, № 8. С. 1132–1142.
13. Шрагер Л.Н., Малахова Л.А. Анализ кариотипов двух видов семейства *Ranunculaceae* // Ботанический журнал. 1979. Т. 64, №5. С. 731–734.
14. Bayliss M.V., Gould A.R. Chromosomal variability in plant tissue culture // International Review Cytology Suppl. 1980. Vol. 11A. P. 113–144.
15. Nagl W. Evidence of DNA amplification in the orchid *Cymbidium in vitro* // Cytobios. 1972. Vol. 5. P. 145–154.
16. Roy S.C. Chromosomal Variations in the Callus Tissues of *Allium tuberosum* and *A. cepa* Brief Report // Protoplasma. 1980. Vol. 102. P. 171–176.
17. Sengupta J., Jha S., Sen S. Karyotype Stability in Long-Term Callus Derived Plants of *Crepis tectorum* L. // Biologia Plantarum (Praha). 1988. Vol. 30. P. 247–251.

**Dorofeev Vyacheslav Yu., Karnachuk Raisa A., Pulkina Svetlana V.,
Komleva Ekaterina V., Dubina Valentina B., Medvedeva Julia V.**

Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

**ATRAGENE SPECIOSA WEINM. CULTURE IN VITRO:
THE CYTOGENETIC ANALYSIS AND FORMATION
OF TRITERPENOID GLYCOSIDES AND FLAVONOIDS**

Atragene speciosa Weinm. can be used as nootropic, adaptogenic, etc. remedy for treatment of some diseases. Biological features of this species do not allow its cultivation. *Atragene speciosa* cell culture *in vitro* has been received. Formation of physiologically active substances, including flavonoides and triterpenoid saponins was discovered in the cells callus culture *in vitro*. Genetic instability of callus culture and several cytotypes on chromosomes number and aberration structure are found.

Key words: *Atragene speciosa* Weinm.; cell culture; *in vitro*; triterpenoid glycosides (saponins); flavonoids; polyploides; aneuploides; chromosomes structure.