

## Эколого-географическая изменчивость копеечника чайного и особенности его размножения в культуре *in vitro*

А. А. ЭРСТ, Т. В. ЖЕЛЕЗНИЧЕНКО, Т. И. НОВИКОВА, О. В. ДОРОГИНА, Е. В. БАНАЕВ

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН  
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101  
E-mail: annaerst@yandex.ru

Статья поступила 25.07.2013

### АННОТАЦИЯ

На основе анализа шести ценопопуляций установлена связь между морфологической изменчивостью по признакам продуктивности и генетической изменчивостью по электрофоретическим спектрам полипептидов семян ценного лекарственного вида *Hedysarum theinum* Krasnob. Разработаны протоколы микрклонального размножения перспективных образцов. Наиболее эффективной для размножения является среда МС, дополненная 5 мкМ БАП, глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л. Побеги успешно укоренены на 1/2 МС, дополненной 7 мкМ НУК.

**Ключевые слова:** *Hedysarum theinum* Krasnob., ценопопуляция, внутривопуляционная изменчивость, надземная и подземная биомасса, продуктивность, электрофоретический спектр, полипептиды семян, микрклональное размножение.

Многие высшие растения являются источниками ценных вторичных метаболитов, способных оказывать влияние на биологические процессы в организме [Harborne, Williams, 2000]. Благодаря широкому спектру активности этих метаболитов, их роль при создании фармацевтических препаратов резко возросла, и на сегодняшний день 25 % используемых веществ имеют природное происхождение [Zhou, Wu, 2006]. При этом запасы большинства лекарственных растений ограничены, многие из них являются редкими и исчезающими, или становятся таковыми из-за неконтролируемых заготовок сырья. В связи с этим актуальнейшей проблемой является оценка устойчивости популяций, их продукционного потенциала, разработка способов размножения видов и методов получения ценных метаболитов альтернативными путями,

в том числе с использованием биотехнологических подходов.

Копеечник чайный (*Hedysarum theinum* Krasnob.) – многолетнее травянистое лекарственное растение, называемое также красным корнем, относится к роду *Hedysarum* L. семейства бобовых (Fabaceae). Редкий высокогорный альпийский вид, имеющий дизъюнктивный центральноазиатский и южносибирский ареалы [Флора Сибири, 1994]. В надземной части *H. theinum* обнаружены моносахара, дисахара, дубильные вещества, витамин С, каротин, вещества ксантоновой природы (мангиферин, изомангиферин) [Неретина и др. 2004; Кукушкина и др., 2011]. Корни растения являются основным источником множества биологически активных веществ, включая олигомерные катехины, изофлавоноиды (медикарпин, вестинол, формононе-

тин, бутилфенолы), а также жирные кислоты [Агафонова, Володарская, 2000; Нечепуренко и др., 2007]. Уникальный состав растения обусловил широкий спектр его лекарственного действия: противовоспалительно-го, бактерицидного, спазмолитического, иммунопротекторного, антиоксидантного [Володарская и др., 1998; Dong et al., 2013].

В результате массовых заготовок сырья в естественных местообитаниях копеечник чайный находится на грани исчезновения, поскольку возобновление популяций нарушено. Чрезвычайно медленный рост приводит к высокой уязвимости вида. Корни растения считаются зрелыми и пригодными к заготовке в 30 лет. Копеечник чайный не размножается вегетативно и начинает цвести к 18 годам, давая много семян, которые хорошо прорастают, но большинство сеянцев погибает через несколько дней, в среднем выживает только 2 % [Карнаухова, 1994].

Цель работы – на основе анализа изменчивости полипептидных спектров запасных белков семян и показателей продуктивности провести отбор перспективных образцов копеечника чайного и ввести их в культуру *in vitro* для клонального микроразмножения.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в пяти ценопопуляциях *H. theinum*, произрастающих в субальпийских и альпийских высотных поясах на территории Юго-Западного и Западного Алтая, и одной интродукционной популяции, выращенной из семян на участке Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (г. Новосибирск) в условиях лесостепного Приобья (табл. 1).

Определение биологической продуктивности подземной и надземной биомассы проводили на 10–20 особях средневозрастного генеративного состояния. При определении возрастных состояний придерживались общепринятой методики [Ценопопуляции..., 1976].

Данные обрабатывались методами статистики и для признаков вычислялись предельные значения (*lim*), среднее арифметическое (*a*) и ошибка среднего ( $\bar{a}$ ) по общепринятым методикам [Зайцев, 1984].

Для разделения полипептидов семян применяли метод электрофореза в полиакриламидном геле [Laemmli, 1970], модифицированный при изучении полиморфизма запасных белков эндосперма (проламинов) семян

Т а б л и ц а 1  
Места сбора *Hedysarum theinum*

№ ценопопуляции	Место сбора	Характеристика местообитания	Характер антропогенного воздействия
1	Западный Алтай, Казахстан, хр. Прорходной <i>H</i> = 1700 м над ур. м.	Разнотравное лиственнично-кедровое субальпийское редколесье	Полусбой-сбой (перевыпас)
2	Западный Алтай, Казахстан, хр. Ивановский <i>H</i> = 1600 м над ур. м.	Разнотравное пихтово-кедрово-лиственничное редколесье	Заготовки. Выпас умеренный, вырубка старая
3	Западный Алтай, Казахстан, хр. Ивановский, урочище Кедровая падь <i>H</i> = 1750 м над ур. м.	Разнотравное лиственнично-кедровое субальпийское редколесье	Умеренный выпас
4	Западный Алтай, Ивановский, урочище Кедровая падь <i>H</i> = 2000 м над ур. м.	Разнотравно-дриадовая тундра	Слабый выпас
5	Юго-Западный Алтай, хр. Холзун, г. Красная <i>H</i> = 1840 м над ур. м.	Разнотравное пихтово-кедрово-лиственничное редколесье	Интенсивные заготовки
6	Отборная интродукционная популяция	Экспозиция ЦСБС СО РАН	Культивирование

у представителей рода *Elymus* L. [Агафонова, Агафонов, 1991]. Использовали трис-глицериновую буферную систему для SDS-электрофореза в 10 и 14 % полиакриламидных гелях, в экстракты белков добавляли редуцирующий агент 0,2 М 2 – меркаптоэтанол. В качестве маркеров выбрали глобулины семян [Агафонова (Дорогина), Агафонова, 2004].

Внутри- и межпопуляционную изменчивость по полипептидным спектрам семян оценивали с помощью коэффициентов сходства [Ayala et al., 1970]. Вычисления проводили для каждой пары спектров внутри и между выборками.

Белковые компоненты регистрировали на миллиметровой бумаге. Построение матрицы проводили по наличию (1) или отсутствию (0) белкового компонента для каждого из образцов. Расчеты выполняли с использованием компьютерных программ Statistica и Bio Diversity.

При проведении работ по микроразмножению копеечника чайного использовали общепринятые методики по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980]. Стерилизацию семян проводили в 20%-м растворе Domestos (20 мин), затем их трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты культивировали на среде МС [Murashige, Skoog, 1962], дополненной 5 мкМ БАП (6-бензиламинопурин), глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л. На этапе укоренения растений использовали 1/2 МС, дополненную 7 мкМ НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусная кислота) или 7 мкМ ИМК ( $\beta$ -индоллилмасляная кислота).

Культивирование эксплантов проводилось в следующих условиях: фотопериод – 16/8 часов свет/темнота, освещенность – 2–3 клк, температура –  $24 \pm 1$  °С. Семена проращивали в термостате при 26 °С в темноте.

Математическую обработку проводили по общепринятым методикам [Зайцев, 1984].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ изменчивости электрофоретических спектров полипептидов семян может являться показателем адаптивности и устойчивости ценопопуляций [Агафонов, Агафоно-

ва (Дорогина), 1990; Агафонова (Дорогина), Агафонова, 2004], следовательно, косвенно отражать ее вероятную продуктивность. Проведенные исследования показали, что все изученные ценопопуляции *H. theinum* полиморфные, при этом изменчивость в ценопопуляциях 1 и 4 самая низкая ( $K_{cx} = 0,67$  и  $0,53$ ), а самая высокая изменчивость обнаружена в выборках из ценопопуляций 5 и 6 ( $K_{cx} = 0,32$  и  $0,36$ ).

В результате изучения надземной и подземной биомассы растений, как и в случае с изменчивостью электрофоретических спектров полипептидов семян, обнаружили, что в популяциях 1 и 4 происходит снижение вариабельности по признакам продуктивности (табл. 2). Эти популяции также отличаются наименьшими средними значениями биомассы.

Одной из возможных причин этого явления могут быть особенности местообитаний: растения ценопопуляции 1 находятся в состоянии дигрессии из-за значительного перевыпаса, а ценопопуляция 4 произрастает на высотном пределе распространения вида – в дриадовой тундре. Более жесткие условия местообитаний отрицательно сказываются на продуктивности подземной и надземной биомассы растений и вызывают снижение вари-

Т а б л и ц а 2  
Изменчивость *Hedysarum theinum* по продуктивности подземной и надземной биомассы

Номер ценопопуляции	Подземная масса, г	Надземная масса, г
1	$\frac{270-510}{370 \pm 27,1}$	$\frac{16-65}{41,3 \pm 5,0}$
2	$\frac{1500-2500}{1870 \pm 134,0}$	$\frac{150-320}{230 \pm 19,8}$
3	$\frac{280-1200}{818 \pm 89,3}$	$\frac{75-190}{140 \pm 15,6}$
4	$\frac{230-490}{397 \pm 29,9}$	$\frac{19-53}{37 \pm 4,4}$
5	$\frac{850-3000}{1630 \pm 128,0}$	$\frac{90-720}{330 \pm 29,8}$
6	$\frac{1200-6000}{2250 \pm 231,0}$	$\frac{80-600}{310 \pm 21,6}$

П р и м е ч а н и е. В числителе – lim, в знаменателе –  $a \pm \bar{a}$ .

бельности по этим показателям. Вероятно, в результате отбора в популяциях происходит закрепление генотипов, адаптированных для данных условий, что приводит к уменьшению генетической изменчивости, выявляемой по электрофоретическим спектрам полипептидов семян.

Несколько большая изменчивость по продуктивности подземной и надземной биомассы выявлена в ценопопуляции 3 (предельные значения 280–1200 г и 75–190 г соответственно). В ценопопуляциях 2 и 5, располагающихся в разнотравно-кустарниковом кедрово-лиственничном субальпийском редколесье, а также в интродуцированной популяции (6), выявлена высокая изменчивость по названным признакам. Для этих же популяций характерны наибольшие средние величины продуктивности подземной и надземной биомассы, что, вероятно, обусловлено благоприятными условиями местообитания вида, в том числе условиями района интродукции. Кроме того, во всех популяциях наблюдается прямая зависимость между показателями надземной и подземной биомассы. Подобную зависимость отмечали Энквист и Никлас на ряде видов древесных растений [Enquist, Niklas, 2002]. Они показали, что у всех изученных ими видов соотношение надземной биомассы и корневой остается, в среднем, постоянным, что значительно облегчает подсчеты скрытой биомассы растений.

О благоприятности условий культивирования интродукционной популяции свидетельствует и предварительный анализ содержания флавоноидов в растениях. Выявлено, что растения из интродуцированной популяции синтезируют больше ксантонов, чем природные [Высочина и др., 2011]. Различия между наиболее перспективной по продуктивности и генетической изменчивости природной ценопопуляции 5 и интродуцированной популяции проявились и при сравнении электрофоретических спектров полипептидов семян. Для растений ценопопуляции 5 характерно наличие компонентов в области выше 84 kD, в то время как в популяции 6 эти компоненты не обнаружены (рис. 1). Отсутствие ряда компонентов, возможно, является следствием неспецифичных для вида условий выращивания.

Так как в выборках из ценопопуляций 5 и 6 обнаружена самая большая изменчивость

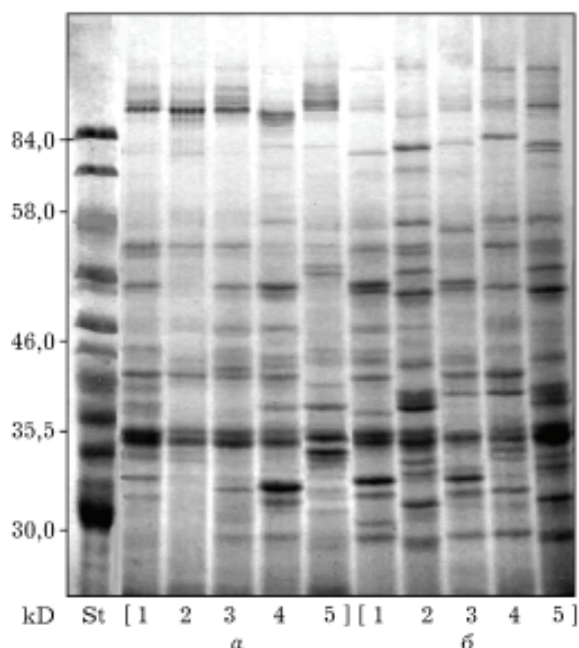


Рис. 1. Индивидуальная изменчивость *Hedysarum theinum* по электрофоретическим спектрам полипептидов семян: а – ценопопуляция 5; б – интродуцированная популяция 6. SDS-система, +Мевариант, St – стандартный образец линии *E. si-biricus* (ALT-1)

по полипептидным спектрам семян, а также наибольший диапазон изменчивости по продуктивности надземной и подземной биомассы растений, их семена использовались в качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* и дальнейшего микроразмножения.

Процент прорастания семян *H. theinum* оказался высоким и составил через 8 дней – 59 %, через 30 дней – 81 %. Применение методов скарификации не требовалось.

В условиях фотопериода выявлено, что на свету у 80 % проростков корни приобретают буровато-красную окраску и происходит последующее потемнение среды для культивирования. Подобное ферментативное побурение эксплантов отмечено в культуре изолированных корней *H. theinum* [Вдовитченко и др., 2007], а также для других видов рода *Hedysarum* – *H. alpinum* L. и *H. neglectum* Ledeb. [Ляпкина и др., 1999].

После появления пары настоящих листьев надземную часть проростков отделяли и переносили на среду МС, дополненную 5 мкМ БАП, глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л. На данной среде через ме-

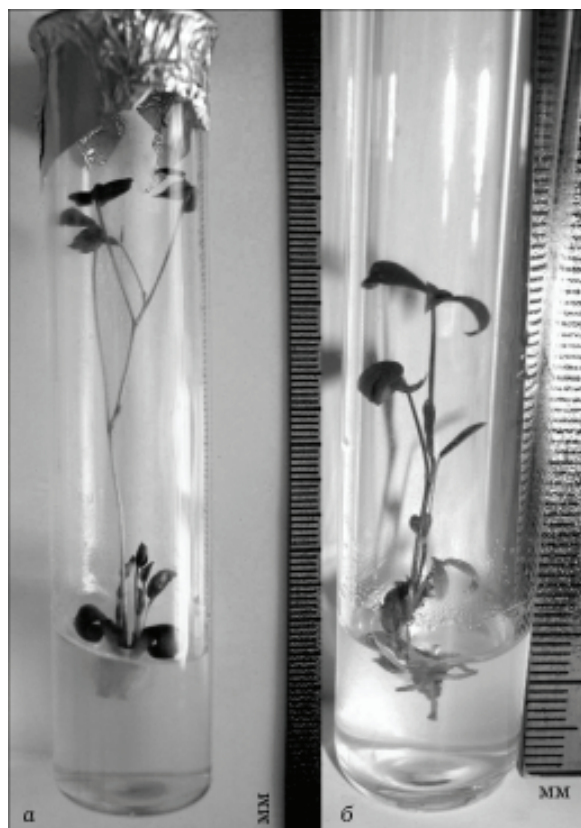


Рис. 2. *Hedysarum theinum* в культуре *in vitro*: а – развитие пазушных почек на среде МС + 5 мкМ БАП + глутатион 200 мг/л + гидролизат казеина 200 мг/л; б – ризогенез на среде 1/2 МС + 7 мкМ НУК

сая развивалось 3–4 побега на эксплант, высотой 7–10 см с 4–5 узлами (рис. 2, а).

Массовое размножение копеечника чайного проводили путем черенкования пробирочных растений на одноузловые сегменты. Минеральная основа среды МС также успешно применялась ранее для культивирования видов рода *Hedysarum* [Arcioni et al., 1985; Ляпкина и др., 1999; Вдовитченко и др., 2007].

Хорошо развитые побеги переносили на среды для укоренения. На средах с ауксинами побеги *H. theinum* укоренялись только через три недели культивирования. Лучшие показатели ризогенеза получены на средах с НУК – 5–7 корней на эксплант (рис. 2, б).

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить связь между морфологической изменчивостью вида по признакам продуктивности и генетической изменчивостью по электрофоретическим спектрам полипептидов семян.

Выявлены наиболее перспективные популяции (5, 6), семенной материал из которых использовали для введения в культуру *in vitro*.

Подобраны условия для массового размножения копеечника чайного. Оптимальной на этапе размножения является среда МС, дополненная 5 мкМ БАП, глутатионом 200 мг/л, гидролизатом казеина 200 мг/л; на этапе укоренения – 1/2 МС, дополненная 7 мкМ НУК.

Дальнейший этап работы заключается в адаптации полученных клонов к условиям *ex vitro*, оценке микроклонов и адаптированных растений на содержание ценных метаболитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке: “Совместного конкурса проектов фундаментальных исследований НАН Беларуси и СО РАН”, интеграционных проектов № 20 и № 12-С-4-1028 и проекта № 30.3 Программы РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов А. В., Агафонова О. В. Электрофоретические спектры проламина у образцов пырея бескорневищного различного происхождения // Генетика. 1990. Т. 26, № 11. С. 1992–2001.
- Агафонова (Дорогина) О. В., Агафонова М. А. Идентификация близкородственных видов *Hedysarum theinum*, *H. neglectum*, *H. austrosibiricum* (Fabaceae) с помощью запасных глобулинов семян // Ботан. журн. 2004. Т. 89, № 10. С. 1637–1645.
- Агафонова О. В., Агафонов А. В., Повышение разрешающей способности электрофоретического метода для таксономических и генетико-селекционных исследований многолетних злаков трибы Пшеницевые (Triticeae). Киев, 1991. 11 с. (Деп. ВИНТИ 23.10.91, № 2467-В91).
- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза у растений. М., Наука, 1964. С. 32–33.
- Вдовитченко М. Ю., Кузовкина И. Н., Пэтц Х., Шнайдер Б. Культивируемые *in vitro* корни копеечника чайного и образование в них фенольных соединений // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 4. С. 604–613.
- Володарская С. Б., Агафонова О. В. Продуктивность и содержание олигомерных катехинов у *Hedysarum theinum* Krasnob. в центральном и юго-западном Алтае // Раст. ресурсы. 2000. Т. 26, вып. 4. С. 47–52.
- Володарская С. Б., Винокурова Е. Ю., Шульц Е. Е. Химическое исследование *Hedysarum theinum* // Физические и биохимические аспекты изучения лекарственных растений: мат-лы Междунар. конф., посвящ. памяти В. Г. Минаевой. Новосибирск, 1998. С. 18–19.

- Высочина Г. И., Кукушкина Т. А., Карнаухова Н. А., Селютин И. Ю. Флавоноиды дикорастущих и интродуцированных растений некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия в интересах уст. развития. 2011. № 19. С. 365–371.
- Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М., Наука, 1984. 424 с.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наук. думка, 1980. 488 с.
- Карнаухова Н. А. Биоэкологическое разнообразие копеечников флоры Хакасии и оценка их позиций в природе и при интродукции // Сиб. экол. журн. 1994. Т. 1, № 6. С. 581–587.
- Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Карнаухова Н. А., Селютин И. Ю. Содержание мангиферина и суммы ксантонов в растениях некоторых дикорастущих и интродуцированных видов *Hedysarum* L. // Раст. ресурсы. 2011. Вып. 1. С. 99–106.
- Ляпкина Н. С., Хадеева Н. В., Шаин С. С., Майсурян А. Н. Разработка методов культивирования тканей копеечника *in vitro* // Биотехнология. 1999. № 1. С. 55–61.
- Неретина О. В., Громова А. С., Луцкий И. В., Семенов А. А. Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (Fabaceae) // Раст. ресурсы. 2004. Т. 40, вып. 4. С. 111–137.
- Нечепуренко И. В., Половинка М. П., Сальникова О. И., Покровский М. Н., Комарова Н. И., Салахутдинов Н. Ф., Нечепуренко С. Б. Компоненты этилацетатного экстракта корней *Hedysarum theinum* Krasnob. // Химия природных соединений. 2007. № 1. С. 6–9.
- Флора Сибири / под ред. А. В. Положий, Л. И. Малышева. Новосибирск, 1994. Т. 9. 279 с.
- Ценопопуляции растений (основные понятия и структура). М., Наука, 1976.
- Arcioni S., Mariotti D., Pezotti M. *Hedysarum coronarium* L. *in vitro* conditions for plant regeneration from protoplasts and callus of various explants // J. Plant Physiol. 1985. Vol. 121, N 2. P. 141–148.
- Ayala G. J., Maura C. A., Perez-Salas S. et al. Enzyme variability in the *Drosophila* Williston group. I. Genetic differentiation among species // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. N 67. P.225–232.
- Dong Y., Tang D. Zhang N., Li Y., Zhang Ch., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* // Chem. Central Journ. 2013. Vol. 7. P. 124–137.
- Enquist B. J., Niklas K. J. Global allocation rules for patterns of biomass partitioning in seed plants // Nature. 2002. Vol. 395. P. 163–165.
- Harborne J. B., Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992 // Phytochemistry. 2000. Vol. 55. P. 481–504.
- Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, N 5259. P. 680–685.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, N 2. P. 473–497.
- Zhou L. G., Wu J. Y. Development and Application of Medicinal Plant Tissue Cultures for Production of Drugs and Herbal Medicinals in China // Natural Product Reports. 2006. Vol. 23. P. 789–810.

## Ecological and Geographic variability of *Hedysarum Theinum* and Characteristics of its Propagation *in Vitro*

A. A. ERST, T. V. ZHELEZNICHENKO, T. I. NOVIKOVA, O. V. DOROGINA, E. V. BANAIEV

FSIS Central Siberian Botanical Garden SB RAS,  
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101  
E-mail: annaerst@yandex.ru

The link between productivity of aboveground and underground biomass and variability of electrophoretic spectra of seeds polypeptides was established on the basis of the analysis of 6 populations of a valuable medicinal species – *Hedysarum theinum* Krasnob. The protocols for microclonal propagation of perspective samples were developed. The most efficient multiplication was achieved in MS medium supplemented with 5  $\mu$ M BAP, 200 mg/l of glutathione and 200 mg/l of casein hydrolyzate. The shoots were successfully rooted on half strength MS basal medium supplemented with 7  $\mu$ M NAA.

**Key words:** *Hedysarum theinum* Krasnob., cenopopulation, intrapopulation variability, productivity of aboveground and underground biomass, electrophoretic spectra, polypeptides of seeds, microclonal propagation.