

# БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.127: 582.923.1 + 58.085

Н. М. ДРОБИК <sup>1</sup>, О. М. ЛЕСЬКОВА <sup>1</sup>, В. М. МЕЛЬНИК <sup>2</sup>, І. І. КОНВАЛЮК <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680

## **БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA L.* ВМІСТ КСАНТОНІВ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН**

Досліджено вміст ксантонів у культурі *in vitro* рослин видів роду *Gentiana L.* з різних місць зростання. Встановлено, що кількість ксантонів у калюсах була значно нижчою, ніж у пагонах інтактних рослин, але вищою або близькою до такої в коренях. Показано відмінності ростових та біосинтетичних характеристик різних культур тканин.

*Ключові слова:* культура тканин, види роду *Gentiana L.*, ксантони, приріст біомаси

Лікувальні властивості видів роду Тирлич (*Gentiana L.*) обумовлені синтезом у цих рослинах численних біологічно активних речовин: іридоїдів, алкалоїдів, ксантонів, флавоноїдів, фенолкарбонових кислот, антоціанів, вуглеводів (глюкози, фруктози, сахарози, генціобіоза, генціаноза) тощо [1, 7, 8, 10]. Відомо, що вміст ксантонів є важливою хемотаксономічною ознакою видів роду *Gentiana* [5, 15]. Ксантони рослин роду *Gentiana* є антидепресантами та інгібіторами моноаміноксидази, проявляють стимулюючу дію на ЦНС, кардіотонічний та туберкулостатичний ефекти [5, 11].

У літературі також є відомості про здатність культури тканин і органів тирличів до синтезу ксантонів. Наприклад, встановлено, що у пагонах рослин *G. lutea*, культивованих в умовах *in vitro* на живильному середовищі без фітогормонів, вміст мангіферину був близьким до такого в листках інтактних рослин і перевищував цей показник при доповненні живильного середовища фітогормонами БАП (0,25 мг/л) та ІОК (0,2 мг/л) [15].

Для низки цінних з фармакологічної точки зору видів *Gentiana* нами підібрано умови для індукції калюсоутворення та проліферації отриманих культур [3, 12]. Завданням даної роботи було дослідження в калюсних культурах тирличів сумарного вмісту однієї з основних груп біологічно активних речовин (БАР) рослин – ксантонів.

### **Матеріал і методи досліджень**

Матеріалом для дослідження слугували культури тканин кореневого походження тирличів, отримані від рослин з різних популяцій, на 11-15-му пасажах вирощування (табл. 1). Тривалість пасажу усіх калюсів становила 4 тижні. Детально умови отримання та вирощування калюсів досліджуваних видів тирличів описано в роботах [3, 12].

Місця зростання досліджених зразків тирличів

Вид	Місце зростання	Висота над рівнем моря (м)	Умовні позначення
<i>G. lutea</i>	полонина Рогнеска (хребет Черногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл.)	1650	G.l.R
	г. Трояска (хребет Свидовець, Рахівський р-н, Закарпатська обл.)	1695	G.l.Tr
	г. Пожижевська (хребет Черногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.)	1420	G.l.P
<i>G. punctata</i>	г. Пожижевська, (хребет Черногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.)	1480	G.p.P
	г. Брескул (хребет Черногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.)	1790	G.p.Br
	г. Трояска (хребет Свидовець, Рахівський р-н, Закарпатська обл.)	1704	G.p.Tr
<i>G. acaulis</i>	г. Туркул (хребет Черногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл.)	1750	G.ac.T
	г. Ребра (хребет Черногора, Рахівський р-н, Закарпатська обл.)	2001	G.ac.Reb
<i>G. asclepiadea</i>	г. Пожижевська (хребет Черногора, Надвірнянський р-н, Івано-Франківська обл.)	1424	G.asc.P
	г. Велика Мигла (Долинський р-н, Івано-Франківська обл.)	950	G.asc.M
<i>G. cruciata</i>	с. Креничі (Обухівський р-н, Київська обл.)	—	G.cr.Kr
	природний заповідник «Медобори» (Гусятинський р-н, Тернопільська обл.)	—	G.cr.Med
<i>G. pneumonanthe</i>	Корюківське лісництво (Корюківський р-н, Чернігівська обл.)	—	G.pn.K
	с. Вигода (Долинський р-н, Івано-Франківська обл.)	450–500	G.pn.V

Сумарний вміст ксантонів визначали за допомогою модифікованого нами хроматоспектрофотометричного методу [4, 8, 11]. Повітряно-суху сировину гідролізували у суміші ацетону і води 1:1 (суміш А), що містила 5% HCl, на водяній бані протягом 1 години. На пластинку із целюлозою наносили три смуги досліджуваного екстракту та одну – розчину стандартного зразка мангіферину. Ще одну смугу залишали для приготування контрольного розчину. Після хроматографування у насиченій 15%-ним розчином оцтової кислоти камері пластинку аналізували в УФ-світлі (360 нм). Відмічені на рівні плями стандартного зразка мангіферину зони, що містять ксантони, та рівню за площею ділянку целюлози на чистій смугі пластинки десорбували у суміші А. Оптичну густину профільтрованих розчинів визначали спектрофотометрично при 369 нм на фоні контрольного розчину.

Сумарний вміст ксантонів у досліджуваних зразках ( $X$ , % від маси абсолютно-сухої сировини) у перерахунку на мангіферин-стандарт вираховували за формулою:

$$X = \frac{P_1 \times V_3 \times V_4 \times D_2 \times 100 \times 100}{V_1 \times D_1 \times P \times V_2 \times (100 - a)},$$

де  $V_1$  – об’єм розчину мангіферину-стандарту, мл;  $V_2$  – об’єм екстракту, нанесеного на хроматограму, мл;  $V_3$  – об’єм розчину мангіферину-стандарту, нанесеного на хроматограму, мл;  $V_4$  – об’єм екстракту, мл;  $D_1$  – оптична густина розчину мангіферину-стандарту;  $D_2$  – оптична густина досліджуваного розчину;  $P$  – наважка сировини, г;  $P_1$  – наважка мангіферину-стандарту, г;  $a$  – втрата в масі при висушуванні сировини, % від маси повітряно-сухої сировини.

Отримані результати кількісного визначення суми ксантонів опрацьовували статистично [6].

### Результати досліджень та їх обговорення

Результати проведеного аналізу показали, що з-поміж чотирнадцяти досліджених калюсів кореневого походження найвище значення суми ксантонів (1,31 %) характерне для культури тканин G.l.R – 0,98 % (табл. 2).

Порівняння корневих калюсів *G. cruciata*, *G. acaulis* та *G. lutea*, отриманих від рослин з різних місць зростання, дозволило встановити суттєві відмінності за кількісним вмістом ксантонів (табл. 2). Зокрема, у калюсній тканині G.cr.Med вміст сполук цього класу у 5,2 раза перевищував аналогічний показник у культурі G.cr.Kr, а в G.ac.T – у 4,3 порівняно з G.ac.Reb. У калюсах G.l.R і G.l.Tr синтезувалося в 2,6 та 2,5 раза відповідно більше ксантонів порівняно із культурою G.l.P.

За літературними даними відомо, що вміст ксантонів у рослинах представників роду *Gentiana* залежить типу тканини, фази розвитку рослини, умов зростання [5, 14].

Таблиця 2

Вміст ксантонів у різних органах інтактних рослин та в культурі тканин деяких тирличів

Зразки	Вміст ксантонів у сухій масі, %		
	Пагони	Корені	Калюсна тканина кореневого походження
G.l.P	2,84±0,15	0,47±0,04	0,38±0,01
G.l.Tr	1,99±0,12	0,43±0,02	0,95±0,06
G.l.R	3,92±0,21	0,55±0,04	0,98±0,08
G.p.Tr	2,73±0,17	2,61±0,19	0,32±0,02
G.p.Br	3,42±0,23	3,29±0,28	0,50±0,04
G.p.P	1,97±0,13*	не визначали	0,28±0,01
G.ac.T	2,11±0,11	0,74±0,04	0,92±0,07
G.ac.Reb	2,78±0,24	0,29±0,02	0,21±0,02
G.asc.P	0,42±0,03	0,08±0,005	0,44±0,03
G.asc.M	0,53±0,04	0,09±0,007	0,64±0,05
G.pn.K	0,28±0,02*	не визначали	-
G.pn.V	0,10±0,006*	не визначали	-
G.cr.Kr	0,40±0,03	0,06±0,003	0,03±0,001
G.cr.Med	0,24±0,02	0,05±0,005	0,18±0,01

Примітки: \* – вміст ксантонів ви значали у рослинах, вирощених з насіння у стерильних умовах *in vitro*; розшифрування умовних позначень зразків *див.* у табл. 1.

Проведені нами дослідження інтактних рослин деяких видів тирличів показали, що вміст ксантонів у їхніх пагонах лежав у межах від 0,097 % до 3,92 %. Зокрема, найбільша кількість цих речовин виявлена у рослинах G.l.R (3,92 %) та G.p.Br (3,42 %) [2]; найменша – у пагонах *G. pneumonanthe* з обох популяцій (0,097 % – G.pn.V і 0,283 % – G.pn.K) та G.cr.Med (0,24 %). У пагонах рослин *G. lutea* із п. Рогнеска синтезується майже вдвічі більше ксантонів порівняно із такими рослин з г. Трояска. Ще більшу відмінність вмісту сполук цього класу встановлено для

*G. cruciata*: у пагонах рослин з медоборської популяції ксантонів виявлено у 2,9 раза більше порівняно з креницькою.

Отже, отримані нами результати свідчать про значний вплив еколого-географічних умов на синтез ксантонів і узгоджуються з літературними даними. Зокрема, при дослідженні зразків надземної частини *G. lutea* з різних місць зростання встановлено коливання сумарного вміст цих БАР від 0,32 до 0,90 % (від маси сухої речовини) [13].

Встановлено також, що в пагонах інтактних рослин досліджених видів показники вмісту ксантонів перевищували такі в коренях: G.I.R – у 7,2, G.I.Tr – у 4,6, G.I.P – у 6, G.ac.Reb – у 9,6, G.ac.T – у 2,9, G.asc.P – у 5,1, G.asc.M – у 5,8, G.cr.Kr – у 6, G.cr.Med – у 5 раз [2]. Необхідно відзначити, що така особливість накопичення ксантонів характерна для більшості рослин. У той же час, нами виявлено достовірної різниці вмісту ксантонових сполук у коренях і надземній частині рослин *G. punctata* з обох досліджених популяцій (табл. 2).

Наразі у фармацевтиці використовують в основному корені та кореневища *Gentiana* [4, 8]. Однак, отримані нами дані та результати фітохімічних і фармакологічних досліджень, проведених іншими авторами [9, 13, 15], вказують на те, що вміст ксантонів у надземних частинах тирличів є вищим, ніж у коренях цих же рослин. Зокрема, при дослідженні екстрактів з інтактних рослин *G. lutea* встановлено, що у листках основну частку усіх ідентифікованих ксантонів складав мангіферин (3,98 % від сухої маси), тоді як у коренях він не виявлений. Інші ксантони – генцизин та його похідні – присутні у листках (ізогенцизин та ізогенцизин-примверозид) і в коренях (генцизин та генцизин-примверозид), однак їх концентрації є низькими (0,03–0,31 % від сухої маси) [15].

Вміст ксантонів в отриманих нами калюсних культурах кореневого походження, за винятком *G. asclepiadea*, був нижчим (у 1,3–13 раз), ніж у пагонах інтактних рослин, проте перевищував такий у коренях: G.asc.M – у 6,9, G.asc.P – у 5,3, G.cr.Med – у 3,8, G.I.Tr – у 2,2 та G.I.R – у 1,8 раза. У той же час, за вмістом ксантонів калюс G.ac.T несуттєво перевищував корені, а в культурах G.I.P та G.ac.Reb сумарний вміст ксантонів був нижчим, але близьким до такого у коренях інтактних рослин цих видів. У культурі тканин G.p.Tr, G.p.Vr та G.cr.Kr вміст досліджених БАР був нижчим, ніж в коренях (табл. 2).

Для оцінки ростових та біосинтетичних характеристик калюсів кореневого походження нами досліджено вихід сухої біомаси та ксантонів у розрахунку на 1 л живильного середовища. Через чотири тижні вирощування калюсних культур тирличів, отриманих від рослин з різних місць зростання, вихід їх сухої маси варіював у межах від 11,6 до 31,5 г/л (рис.). Цей показник був найвищим для калюсів *G. cruciata* від рослин з обох досліджених популяцій (29,7 г/л – G.cr.Med та 31,5 г/л – G.cr.Kr). Найменша інтенсивність росту характерна для калюсів G.asc.P та G.asc.M – вихід їхньої сухої біомаси на 1 л живильного середовища складав 11,6 та 18 г.

Оцінка біосинтетичних характеристик культури тканин тирличів показала їхню здатність накопичувати від 11 до 249 мг ксантонів у розрахунку на 1 л живильного середовища. Цей показник був найвищим (249, 235 та 196 мг) у калюсах G.I.R, G.I.Tr та G.ac.T відповідно, а найнижчим – у культурі G.cr.Kr, G.asc.P та G.cr.Med (рис.).

Як видно з наведених даних, умови вирощування для більшості калюсних культур кореневого походження сприяли як приросту біомаси, так і синтезу ксантонів. Проте у деяких випадках, наприклад, для калюсу G.asc.P характерними були низькі значення показників як виходу сухої біомаси, так і ксантонів. В інших – при високій інтенсивності росту, ксантонів у культурі тканин не виявлено (G.pn.V та G.pn.K), або ж їх вміст був невисоким (G.cr.Kr, G.cr.Med, G.ac.Reb).

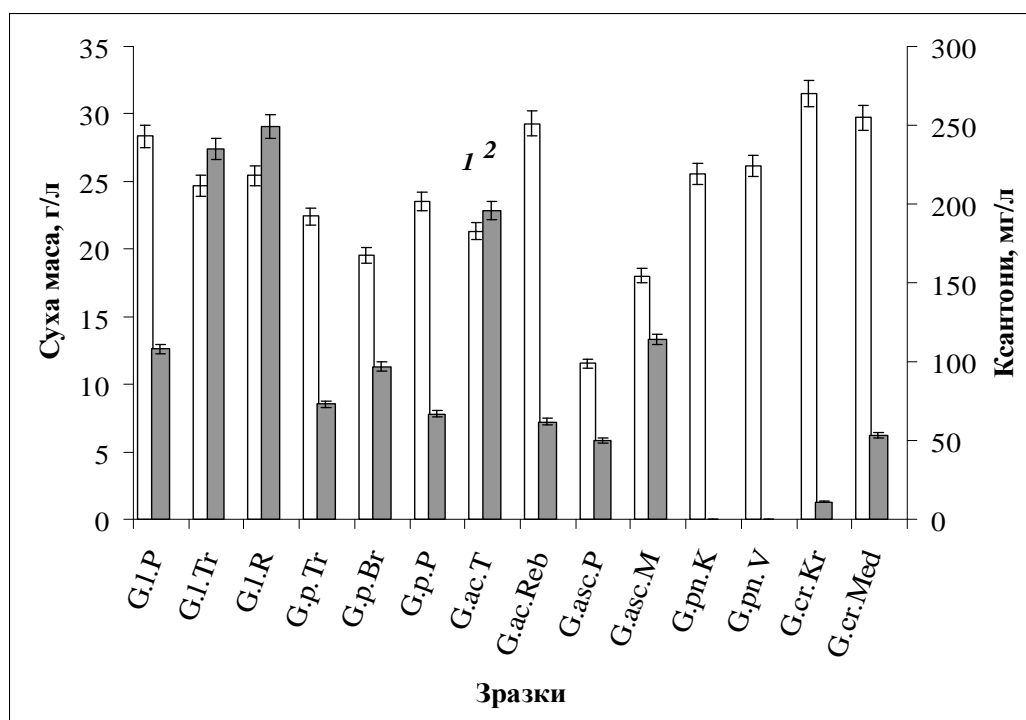


Рис. Продуктивність культури тканин тирличів:

1 – суха маса (г/л) і 2 – ксантони (мг/л).

Примітка. Розшифрування умовних позначень зразків див. у табл. 1.

### Висновки

Встановлено, що досліджені культури тканин тирличів, за винятком *G. pneumonanthe* (від рослин з вигодської та корюківської популяції), здатні до синтезу ксантонів.

Вміст цих вторинних метаболітів варіював як у калюсах від рослин різних видів тирличів, так і в культурах тканин одного виду, отриманих від рослин з різних місць зростання. Кількість ксантонів у калюсах була більшою або близькою до такої в коренях, але меншою, ніж у пагонах рослин природних популяцій. Підібрані умови вирощування для більшості культур тканин сприяли як приросту біомаси, так і синтезу ксантонів. Поряд із цим, для деяких калюсів (*G. asclepiadea*, пожижевська популяція) характерна низька біосинтетична активність на фоні низького приросту біомаси, для інших – відсутність ксантонів (*G. pneumonanthe* від рослин з обох популяцій) або ж їх незначна кількість (*G. cruciata* від рослин з обох популяцій та *G. acaulis* від рослини з реберської популяції) при інтенсивному рості культури.

1. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. 1. Біосинтез та фізіологічна дія / Н. М. Страшнюк, О. М. Леськова, Г. Я. Загричук [та ін.] // Фітотерапія. Часопис. – 2006. – №1. – С. 31–41.
2. Біологічно активні речовини видів роду *Gentiana* L. 2. Вміст ксантонів у рослинах Українських Карпат / О. М. Леськова, Н. М. Страшнюк, Г. Я. Загричук [та ін.] // Фітотерапія. Часопис. – 2006. – №3. – С. 53–55.
3. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. / Н. М. Страшнюк, Л. Р. Грицак, О. М. Леськова [та ін.] // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327–334.
4. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1990. – С. 312–314.
5. Денисова-Дятлова О. А. Природные ксантоны / Ольга Александровна Денисова-Дятлова, Владимир Иванович Глызин // Успехи химии. – 1982. – Вып. 10. – С. 1753–1773.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов / Георгий Филиппович Лакин. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
7. Лікарські рослини: енциклопедичний довідник / [Лебеда А. П., Джуренко Н. І., Ісайкіна О. П. та ін.]; відп. ред. А. М. Гродзінський – К.: В-во «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. – С. 430–432.

8. Николаева Г. Г. Фитохимическое исследование растений семейства горечавковых флоры Сибири: дис. ... доктора фармацевт. наук: 15.00.02 / Галина Григорьевна Николаева. – М., 2000. – С. 34–50.
9. О перспективах использования надземной части горечавки желтой в качестве лекарственного сырья / С. М. Николаев, А. Д. Бакуридзе, Т. Д. Даргаева [и др.] // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. – 1987. – Вып. 3. – С. 67–70.
10. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Caprifoliaceae* – *Plantaginaceae*. – Л.: Наука, 1990. – 328 с.
11. Содержание мангиферина у видов сем. *Gentianaceae* / П. Б. Лубсандоржиева, Г. Г. Николаева, В. И. Глызин [и др.] // Растит. ресурсы – 1986. – Т.21, вып. 2. – С. 233–236.
12. Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) / Н. М. Страшнюк, М. О. Твардовська, В. М. Мельник // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія. – 2006. – №2 (29). – С. 100–107.
13. Хроматоспектрофотометрическое определение содержания  $\gamma$ -пироновых соединений в надземной части *Gentiana lutea* L. / А. Д. Бакуридзе, Н. Г. Цагареишвили, Т. Д. Даргаева [и др.] // Раст. ресурсы. – 1991. – Т.27, вып. 4. – С. 115–119.
14. Menković N. Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in leaves and flowers / N. Menković, K. Šavikin-Fodulović, K. Savin // *Planta Med.* – 2000 – Vol.66, №2. – P. 178–180.
15. Quantitative determination of secoiridoid and gamma-pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured *in vitro* / N. Menković, K. Šavikin-Fodulović, I. Momcilovic [et al.] // *Planta Med.* – 2000. – Vol.66, №1 – P. 96–98.

Н. М. Дробык, Е. Н. Леськова, В. Н. Мельник, И.И. Конвалюк

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

#### БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ВИДОВ РОДА *GENTIANA* L. СОДЕРЖАНИЕ КСАНТОНОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Исследовано содержание ксантонов в культуре *in vitro* растений видов рода *Gentiana* L. из различных мест произрастания. Установлено, что количество ксантонов в каллусах было значительно ниже, чем в побегах интактных растений, но выше или близким к таковому в корнях. Показаны отличия ростовых и биосинтетических характеристик разных культур тканей.

Ключевые слова: культура тканей, виды рода *Gentiana* L., ксантоны, прирост биомассы

N. M. Drobyk, O. M. Les'kova, V. M. Mel'nyk, I. I. Konvalyuk

#### BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF *GENTIANA* L. SPECIES. XANTHONE CONTENTS IN TISSUE CULTURE

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

Xanthone contents have been studied in tissue culture derived from gentians grown in different habitats. Calluses were found to show much lesser xanthone abundance than that of intact plant shoots but higher or close to that of roots. Differences in growth and biosynthetic characteristics for various tissue culture were demonstrated.

Key words: tissue culture, *Gentiana* L. species, xanthone, biomass growth increment

Рекомендує до друку

Надійшла 3.09.2010

В.В. Грєбїнко