

УДК 582.892:576.316.7(571.63)

Ю.А. Хроленко
 О.Л. Бурундукова
 Л.С. Лауве
 Т.И. Музарок
 Ю.Н. Журавлев

Yu.A. Khrolenko
 O.L. Burundukova
 L.S. Lauve
 T.I. Muzarok
 Yu.N. Zhuravlev

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЯДРЫШЕК В КЛЕТКАХ *PANAX GINSENG* IN VIVO И IN VITRO

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF NUCLEOLI IN THE CELLS OF *PANAX GINSENG* IN VIVO AND IN VITRO

Аннотация. В статье представлены результаты кариологического исследования нативных растений и нескольких каллусных линий *Panax ginseng*. В интерфазных ядрах нативных растений встречается от 1 до 2 ядрышек, в то время как в каллусных клетках *P. ginseng* интерфазные ядра содержат от 1 до 9 ядрышек. Данные демонстрируют, что при длительном культивировании (с 1988 г.) наблюдаются цитогенетические изменения, такие как увеличение уровня полиплоидных и анеуплоидных клеток в культуре, увеличение числа ядрышек в интерфазных ядрах и уменьшение ядерно-ядрышкового отношения в сравнении с клетками нативных растений. Это способствует усилению биосинтетических процессов в каллусных клетках женьшеня настоящего.

Ключевые слова: *Panax ginseng*, in vivo, in vitro, ядрышки, ядерно-ядрышковое отношение.

Summary. Results of karyological study of the native plants and some callus lines of *Panax ginseng* are presented. In the native plants of *P. ginseng*, the nucleus with 1 nucleolus (90%) dominate, and nucleus with 2 nucleoli is rare. Interphase nuclei of *P. ginseng* in long cultivated lines (from 1988) contain 1–9 nucleoli, with a predominance of nuclei containing from 3 to 4 nucleoli. It was shown that long-time cells (cultivated since 1988) had cytogenetic changes such as increased level of polyploid and aneuploid cells, increase of nucleoli number into interphase nucleus and decrease of nuclei/nucleoli ratio.

Key words: *Panax ginseng*, in vivo, in vitro, nucleoli, nuclear-nucleolar ratio.

Женьшень настоящий – *Panax ginseng* С.А. Меу. (Araliaceae) – многолетнее травянистое лекарственное растение. Женьшень настоящий является редким реликтовым видом, он занесен в Красные книги СССР (1984) и РСФСР (1988), а в 2000 г. решением конференции сторон Конвенции по международной торговле вымирающими видами дикой фауны и флоры (СИТЕС) *P. ginseng* дикорастущий (корни) был включен во II-е приложение СИТЕС. Введение в культуру in vitro женьшеня настоящего и создание коллекции его клеточных культур является одним из элементов стратегии сохранения его генофонда. Клеточные культуры *P. ginseng* используются для выполнения работ по изучению синтеза вторичных метаболитов и для получения альтернативного источника биологически активных веществ (Булгаков и др., 2000; Козыренко и др., 2001; Кунах и др., 2003). Зачастую при введении в кле-

точную культуру растительные клетки теряют генетическую стабильность, и прослеживается формирование высокого уровня полиплоидии и анеуплоидии (Bayliss, Gould, 1980). В литературе имеются сведения о хромосомных числах дикорастущего женьшеня настоящего, для данного вида установлены числа хромосом $2n=24, 44, 48$ (Грушвицкий, 1961; Гурзенков, Коляда, 1996; Лауве и др., 2008) и кратко описан кариотип. Доказательством генетической изменчивости клеток растений, культивируемых в условиях in vitro, могут послужить данные цитологического анализа хромосом, но подробное описание кариотипа сделать сложно, поскольку у женьшеня настоящего мелкие хромосомы – от 2 до 5 мкм и менее. Достоверность измерений длины таких хромосом весьма сомнительна, так как разрешающая способность светового микроскопа составляет 0.5 мкм (Гриф, 1992). Однако существу-

Лаборатория биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН, пр-т 100-летия Владивостока, 159; 690022, Владивосток, Россия; e-mail: khrolenko@biosoil.ru, burundukova@ibss.dvo.ru, muzarok@biosoil.ru
 Laboratory of Biotechnology, Pacific Institute of Biology and Pedology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 100-letiya Vladivostoka ave., 159; 690022, Vladivostok, Russia

Поступило в редакцию 20.12.2010 г.

Submitted 20.12.2010

ют методы, с помощью которых влияние физических и химических факторов на живые объекты фиксируется не по структурным перестройкам кариотипа, а по изменениям функциональной активности генома клетки (Архипчук и др., 1992). Так, весьма успешно используются ядрышковые характеристики в качестве высокочувствительных биотестов. По числу ядрышек и их размерам в клетках можно оценить активность генов рибосомной РНК на цитологическом уровне (Кикнадзе, 1972; Челидзе, 1985). В работе Т.Ю. Горпенченко (2006) отмечено, что в каллусных клетках женьшеня настоящего встречаются ядра с двумя и большим числом ядрышек.

В данной работе с помощью кариометрического метода проведено исследование активности ядрышкообразующего локуса у нативных растений женьшеня настоящего и его клеточной культуры.

Материалы и методы

Цитологический анализ проводился на клетках апикальной меристемы корешков проростков женьшеня настоящего, выращенных в коллекционном питомнике Биолого-почвенного института ДВО РАН, а также в эксперименте была использована каллусная линия женьшеня настоящего под условным номером 1с. Получение клеточных линий и условия их выращивания приведены в работе М.М. Козыренко с соавторами (2001). Для цитологии использовались стандартные методики, модифицированные применительно к данному объекту (Смирнов, 1968; Муратова, 1995). Небольшие кусочки (объемом 0.5–1 мл) каллусных тканей и проростки нативных растений обрабатывали 0.2% колхицином в течение 2 ч. В качестве фиксатора использовали уксуснокислый спирт (1:3). Перед окрашиванием материал протравливали 4% железо-аммонийными квасцами. В качестве красителя использовали ацетогематоксилин. Ядрышки окрашивали 50%-ным раствором азотнокислого серебра при 42–45°C в течение 6–7 ч. В ацетогематоксилине материал выдерживали в течение 12–24 ч при комнатной температуре. Окрашенный материал помещали на предметное стекло в каплю насыщенного раствора хлоралгидрата; накрывали покровным стеклом и готовили давленный препарат. Далее препарат накрывали фильтровальной бумагой и притирали покровное стекло к предметному обратной стороной пинцета до появления колец Ньютона. Готовые

препараты предварительно просматривали под микроскопом Leica DMLS (Leica Microsystems, Germany), а затем фотографировали в масляной иммерсионной системе под микроскопом Аxioskop-40 с помощью встроенной видеокамеры AxioCam HRc (Zeiss, Germany). Определяли показатели, которые характеризуют ядрышковую активность: число клеток с разным числом ядрышек, среднее число ядрышек на клетку, диаметр (площадь) ядрышка и размер ядрышек на клетку (суммарный показатель), ядерно-ядрышковое отношение (отношение площади ядра к суммарной площади ядрышек в этом ядре).

Результаты и обсуждение

Женьшеню настоящему свойственна хромосомная мозаичность как для каллусной культуры, так и для дикорастущих растений (Булгаков и др., 2000; Козыренко и др., 2001). Для последних известны диплоидные $2n=24$ и тетраплоидные $2n=48$ цитотипы (Лауве и др., 2008). У исследуемых растений в делящихся клетках встречались от 10 до 60 хромосом, у каллусных клеток от 10 до 100 хромосом, но клетки с $2n=48$ хромосом составляли модальный класс (рис. 1а). Изучение ядрышек в интерфазных ядрах у *Panax ginseng* показало, что их число варьирует в клетках целых растений от 1 до 2, а у клеток каллусных линий от 1 до 9 (рис. 1б; рис. 2). В первом варианте среднее число ядрышек на клетку составляет 1.14 ± 0.03 , во втором, соответственно, 4.3 ± 0.17 . Частота встречаемости ядрышек в интерфазных ядрах у женьшеня настоящего представлена на рис. 3. У нативных растений наиболее часто встречаются интерфазные ядра с 1 ядрышком (90%), значительно меньше ядер с 2 ядрышками (10%). У длительно пассируемых клеточных культур чаще встречаются интерфазные ядра с 3, 4 и 5 ядрышками, – на них в сумме приходится 60% всех клеток.

Формирование ядрышек обусловлено активностью определенных локусов хромосом – ядрышковых организаторов, расположенных чаще всего в районах вторичных перетяжек хромосом, где находятся гены, контролирующие синтез рРНК и образование рибосом – пусковых механизмов синтеза белка (Кикнадзе, 1972). По числу ядрышек, образующихся в телофазе митоза, можно судить о количестве нуклеолярных хромосом. По максимальному числу ядрышек в интерфазных ядрах можно определить количество ядрышкообразующих хромосом. Интер-

Таблица

Параметры ядра и ядрышка у *Panax ginseng*: целые растения, каллусные линии

<i>Panax ginseng</i> (число изученных ядер)	Площадь ядра (мкм ²)	Площадь ядрышка (мкм ²)	Ядерно-ядрышковое отношение
Нативные растения (663)	882.77±85.04	68.01±10.49	12.98±0.54
Клетки культивируемой линии 1с (252)	961.63±60.63	100.27±3.76	9.59±1.01

фазные ядра нативных растений женьшеня настоящего содержат от 1 до 2 ядрышек, что позволяет предположить наличие 1 пары нуклеолярных хромосом. В то время как у каллусных клеток женьшеня настоящего интерфазные ядра содержат от 1 до 9 ядрышек, что дает возможность предположить функционирование 4–5 пар нуклеолярных хромосом.

Хорошим показателем активности белоксинтезирующей системы в клетке является ядерно-ядрышковое отношение (Шахбазов, Шестопалова, 1971). Этот показатель отражает различия в уровне биосинтеза белка, а именно, уменьшение ядерно-ядрышкового отношения свидетельствует о возрастании объема ядрышка в ядре и усилении биосинтетических процессов в клетке, и наоборот. Данные по величине ядерно-ядрышкового отношения показывают, что для нативных растений женьшеня настоящего оно составляет 12.98 ± 0.54 , а у каллусов 9.59 ± 1.01 (см. табл.).

На основании полученных данных можно говорить о том, что синтез рРНК и некоторых этапов формирования рибосом, а следовательно, и белка у клеток культивируемых линий женьшеня настоящего идет значительно энергичнее из-за большего количества ядрышковых организаторов. Вероятно, при длительном пассировании происходит дополнительная активация ядрышкообразующих районов, инертных у

нативных растений. Большое число ядрышек в интерфазных ядрах, по-видимому, также связано с более высоким уровнем пloidности (в культуре очень велика доля миксопloidных клеток с $2n=91, 100$).

Из литературы известно, что некоторые виды сохраняют стабильность морфологии хромосом при длительном культивировании каллуса (Sengupta et al., 1988). Так и для клеток каллусных линий женьшеня настоящего было показано, что модальный класс числа хромосом у них такой же, как и у интактных растений, но при этом каллусные линии характеризовались высоким уровнем анеупloidии, и в то же время имели низкий уровень изменчивости ДНК, определяемого методом RAPD (Козыренко и др., 2001). Настоящие данные демонстрируют, что, в отличие от нативных растений женьшеня настоящего, у которого в кариотипе 1 пара хромосом с вторичными перетяжками, у каллусных линий их число увеличивается до 4–5 пар. М.М. Козыренко с соавторами (2001) показали, что для культуры 1с характерны миксопloidные клетки с максимальным числом хромосом $2n=72$, и они составляют 5% от исследованных. В настоящей работе по прошествии 9 лет у каллусных клеток культуры 1с встречаются миксопloidы $2n=91, 100$, и их доля в культуре составляет 25%, что, вероятно, и сказывается на числе ядрышек в интерфазных ядрах.

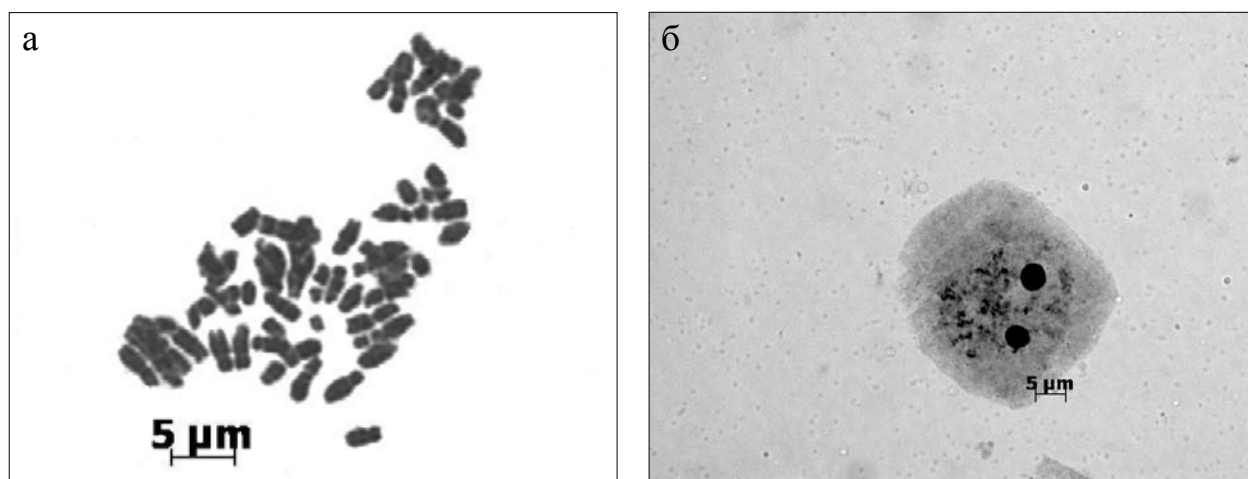


Рис. 1. Клетки нативных растений женьшеня настоящего: а – хромосомный набор, б – ядрышки.

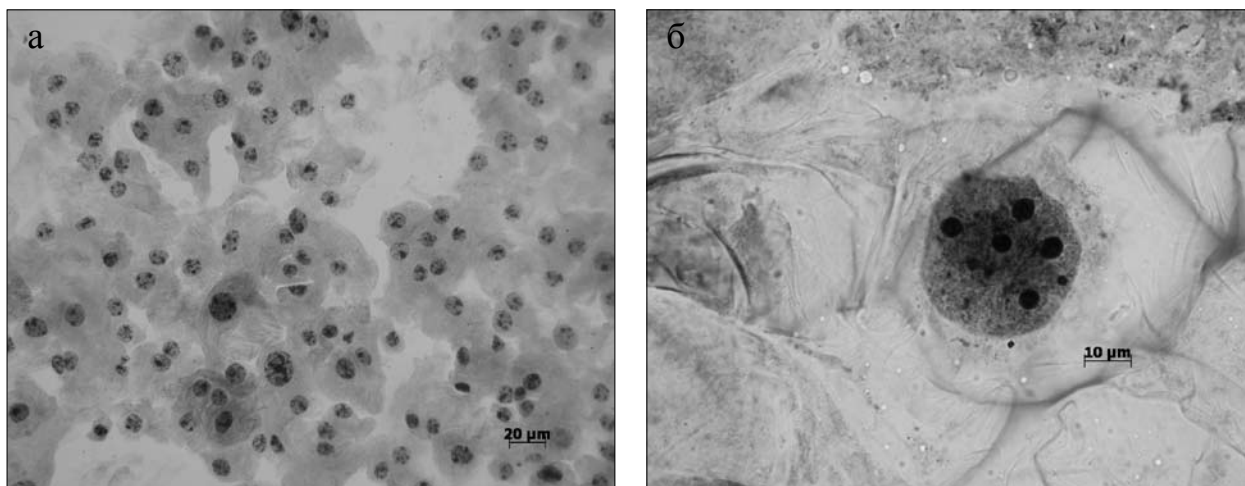


Рис. 2. Клетки каллусной линии 1с женьшеня настоящего: а – общий вид культивируемых клеток, б – ядрышки в интерфазных ядрах.

Общее число ядрышек на ядро увеличивается при полиплоидии, а также анеуплоидии, но увеличение наборов хромосом не ведет к автоматическому удвоению суммарного объема ядрышек (Кикнадзе, 1972, Челидзе, 1985, Бондарь и др., 1987). Примеры полиплоидизации клеточных культур приведены в работах В.А. Кунах с соавторами (2003) у женьшеня настоящего, В.Ю. Дорофеева с соавторами (2009) у княжика сибирского. Авторы предполагают, что изменение уровня флавоноидов и сапонинов (класс соединений, включающий в себя гликозиды) является результатом генетической изменчивости в культуре *in vitro*, в основе которой лежит изменение плоидности (Кунах и др., 2003; Дорофеев и др., 2009). Причем у женьшеня настоящего полиплоидизация приводила к интенсификации роста, но не сопровождалась повышенным накоплением тритерпеновых гликозидов, а у княжика сибирского, наоборот, способствовала уве-

личению содержания сапонинов практически в 2 раза. Наибольший уровень накопления гликозидов свойственен клеточным культурам женьшеня, близким по цитогенетическим параметрам к интактным растениям (Кунах и др., 2003).

Таким образом, возможно, что ядрышковый тест будет сигнализировать о процессах биосинтеза в культивируемых клетках женьшеня настоящего, и по его результатам можно будет судить насколько культивируемые клетки близки к клеткам нативных растений.

Выводы.

1. В интерфазных ядрах нативных растений *P. ginseng* встречается от 1 до 2 ядрышек, что позволяет предположить наличие 1 пары нуклеолярных хромосом.

2. В каллусных клетках *P. ginseng* интерфазные ядра содержат от 1 до 9 ядрышек, что позволяет предположить наличие 4–5 пар нуклеолярных хромосом.

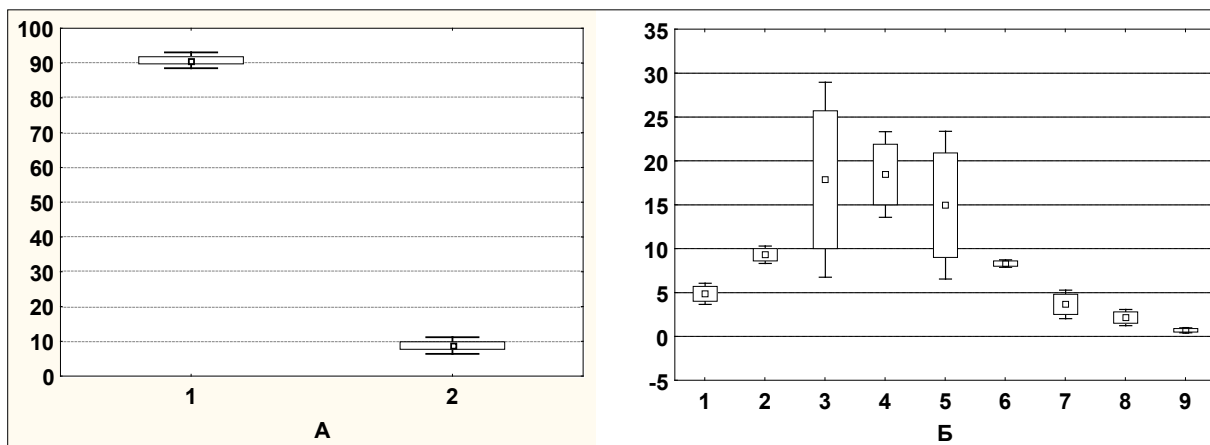


Рис. 3. Число ядрышек в интерфазных ядрах *Panax ginseng*: А – в клетках нативных растений, Б – в клетках каллусных линий. По вертикали – число случаев (встречаемость), %; по горизонтали – число ядрышек, шт.

□ среднее □ стандартная ошибка I стандартное отклонение

3. Ядерно-ядрышковое отношение у нативных растений составляет 12.98 ± 0.54 , а у каллусов 9.59 ± 1.01 . Уменьшение этого показателя свидетельствует о возрастании объема ядрышкового материала в ядре и усилении биосинтетических процессов в каллусных клетках женьшеня настоящего.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность за методическую под-

готовку, советы и подбор литературных источников д. б. н., профессору Е.Н. Муратовой (Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН). Авторы благодарят ведущего инженера лаб. биотехнологии Л.Д. Селецкую за предоставленную биомассу клеток каллусных линий женьшеня. Работа частично поддержана грантом ДВО РАН (проект № 09-II-YO-06-006) и грантом МКБ Президиума РАН.

ЛИТЕРАТУРА

Архипчук В.В., Романенко В.Д., Архипчук М.В., Кипнис Л.С. Цитогенетический метод определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных // Доклады АН, 1992. – Т. 326, № 5. – С. 908–910.

Бондарь Л.М., Частоколенко Л.В., Баранова В.А. Популяционный анализ активности ядрышкового организатора у растений *Vicia cracca* L. // Генетика, 1987. – Т. 23, № 2. – С. 317–324.

Булгаков В.П., Лауве Л.С., Чернодод Г.К., Ходаковская М.В., Журавлев Ю.Н. Хромосомная вариабельность клеток женьшеня, трансформированных растительным онкогеном *rolC* // Генетика, 2000. – Т. 36, № 2. – С. 209–216.

Горпенченко Т.Ю. Влияние гена *rolC* агробактерий на процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза в клеточной культуре *Panax ginseng* С.А. Мей. // Дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2006. – 122 с.

Гриф В.Г. Перспективы развития кариологии растений // III совещ. по кариологии раст.: Тез. докл. – СПб., 1992. – С. 17–18.

Гурзенков Н.Н., Коляда А.С. Изучение кариотипа *Panax ginseng* С.А. Meyer (Araliaceae) // Биологические исследования на Горнотаежной станции. – Владивосток: Дальнаука, 1996. – Вып. 3. – С. 101–105.

Дорофеев В.Ю., Карначук Р.А., Пулькина С.В., Комлева Е.В., Дубина В.Б., Медведева Ю.В. Культура княжика сибирского (*Atrage ne speciosa* Weinm.) in vitro: цитогенетический анализ и образование тритерпеновых гликозидов и флавоноидов // Вестник Томского гос. ун-та. Биология, 2009. – № 3 (7). – С. 37–41.

Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Реунова Г.Д., Журавлев Ю.Н. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология, 2001. – № 1. – С. 19–26.

Красная книга СССР. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. – М.: Лесная пром-сть, 1984. – Т. 2. – 480 с.

Красная книга РСФСР (растения). – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.

Кунах В.А., Можилевская Л.П., Адонин В.И., Губарь С.И. Продуктивность и генетическая структура клеточных популяций женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мей. в культуре in vitro // Биотехнология, 2003. – № 3. – С. 25–35.

Лауве Л.С., Бурундукова О.Л., Музарок Т.И., Журавлев Ю.Н. Числа хромосом женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мей. // Бот. журн., 2008. – Т. 93, № 1. – С. 158–161.

Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Бот. журн., 1995. – Т. 80, № 2. – С. 82–86.

Смирнов Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология, 1968. – Т. 10, № 12. – С. 1601–1602.

Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом. – Л.: Наука, 1972. – 211 с.

Челидзе П.В. Ультраструктура и функции ядрышка интерфазной клетки. – Тбилиси: Мецниереба, 1985. – 119 с.

Шахбазов В.Г., Шестопалова Н.Г. Некоторые особенности ядрышка и ядра в клетках гибридного лука // Доклады АН СССР, 1971. – Т. 196, № 5. – С. 1207–1208.

Bayliss M.V., Gould A.R. Chromosomal variability in plant tissue culture // International Review Cytology Suppl., 1980. – Vol. 11A. – P. 113–144.

Sengupta J., Iha S., Sen S. Karyotype stability in long-term callus derived plants of *Crepis tectorum* L. // Biologia Plantarum (Praha), 1988. – Vol. 30. – P. 247–251.