

А.-К. Э. Эргашев, О. Я. Весманова,
У. К. Наджимов, А. М. Рашкес, Я. В. Рашкес

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ХЛОПЧАТНИКА

Проведена идентификация и сравнительный анализ ряда вторичных метаболитов в культурах тканей и клеток хлопчатника вида *Gossypium arboreum* L. Обнаружено, что изученные суспензионные культуры более богаты, чем каллусные культуры, наличием стигмастерина, фукостерина, сложных эфиров стероидов и тритерпеноидов, а также при-месью амирина, и возможно, убихинона-9.

Известно, что культура клеток и тканей высших растений открывает широкие возможности для изучения вторичного метаболизма и использования метода культивирования *in vitro* с целью получения разнообразных биологически активных соединений в промышленных условиях [1—4]. Применению культуры клеток в биотехнологии обычно препятствует снижение биосинтетического потенциала продуцирования вторичных соединений [1]. Для полной реализации генетической информации требуются специфические условия. В настоящее время получены культуры клеток и тканей большого числа видов хлопчатника, в частности *G. arboreum* L. [5]. Однако процессы вторичного метаболизма хлопчатника в культуре *in vitro* и возможности использования различных метаболитов в биотехнологических целях остаются практически неизученными.

Целью данного исследования было выделение тканевой и клеточной культур *G. arboreum* L. и идентификация их вторичных метаболитов.

Каллусную ткань получали из отрезков гипокотыля стерильных проростков *G. arboreum* var. *salvianum*. Проростки и ткани культивировали при люминесцентном освещении лампами дневного света (3—5 клк, фотопериод 16 ч) и температуре 28 ± 2 °С. Использовали среду: минеральная часть по Мурасиге — Скугу, инозит — 100 мг/л, тиамин-НС1 — 0,4 мг/л, глюкоза — 3 %; агар — 0,75 %, рН 5,7, α -нафтилуксусная кислота (НУК) — $1 \cdot 10^{-6}$ М, N-фенил-N-(1, 2, 3-тиадиазолил-5) мочевины (дефолиант «дропп» фирмы «Shering», ФРГ) — $1 \cdot 10^{-8}$ М. Суспензионную культуру клеток выделяли из каллусной ткани на вышеприведенной среде (без агара); культивировали в эрленмейеровских колбах объемом 0,5 л (200 мл среды) в условиях непрерывного перемешивания на качалке (принудительного типа) с рабочими параметрами: 120 об/мин, интервал 30 мин через каждые 6 ч. Для анализа вторичных метаболитов использовали 21-дневные каллусную и суспензионную культуры. 150 г сырой массы исчерпывающе экстрагировали последовательно три раза метанолом в соотношении растворитель : масса — 3 : 1, затем бензолом и хлороформом. При экстракции последних растительную массу оставляли на сутки при 0 °С (в холодильнике), в течение дня растворитель дважды декантировали. Вытяжки объединяли, растворитель отгоняли на ротационном испарителе при температуре 40—45 °С. Остаток исследовали масс-спектрометрией на приборе МХ-1310, прямой ввод проб СВП-5, температура ампулы-испарителя в диапазоне 110—220 °С, ионизирующее напряжение 50 В.

Полученная каллусная ткань типа friable, зеленого цвета, характеризуется высокой жизнеспособностью и темпом нарастания. Суспензионная культура бурого цвета, средняя плотность $1 \cdot 10^5$ клеток в 1 см³.

В пробах по мере возрастания температуры прямого ввода обнаружены соединения, представленные в таблице.

Сравнивая качественный состав обнаруженных в пробах веществ, можно сделать вывод о том, что суспензионные культуры *G. arboreum* более богаты наличием стигмастерина, фукостерина, сложных эфиров

Вторичные метаболиты в культуре тканей и клеток хлопчатника
Secondary metabolites in cell and tissue cultures of cotton

Проба	Вещество	Характерный пик молекулярного иона (m/z)
Каллус	Ситостерин	414 (M ⁺), 329, 303
	α-Токоферол	430 (M ⁺), 165, 161
	Кампастерин	M ⁺ = 400
	Холестерин	M ⁺ = 386
	Сложные эфиры ситостерина	396
Суспензия	Ситостерин	—
	Стигмастерин	—
	Кампастерин	—
	Изофукостерин	—
	Примесь амирина	M ⁺ = 426
	α-Токоферол	—
	Сложные эфиры стероидов и тритерпеноидов	M ⁺ = 676 M ⁺ = 664
Убихинон-9	M ⁺ = 796	

стероидов и тритерпеноидов, а также примесью амирина и, возможно, убихинона-9. Хотелось бы отметить, что вещества типа ситостерина, кампастерина, стигмастерина обнаружены в культурах *Solanum aviculare* [6].

Дальнейшее изучение вторичных метаболитов, синтезируемых в суспензии клеток хлопчатника, представляет интерес в связи с возможностью использования суспензии в биотехнологии для получения отдельных биологически активных веществ или их суммы в определенном соотношении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Запрометов М. Н. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений // Культура клеток растений.— М.: Наука, 1981.— С. 37—50.
2. Bohm H. Secondary metabolism in cell cultures of higher plants and problems of differentiation // Secondary metabolism and differentiation / Eds M. Luckner et al.— New York: Springer, 1977.— P. 103—123.
3. Butcher D. N. Secondary products in tissue cultures // Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture / Eds J. Reinert et al.— New York: Springer, 1977.— P. 668—693.
4. Tabata M. Recent advances in production of medical substances by plant cell cultures // Plant tissue and its biotechnological application / Eds W. Barz et al.— New York: Springer, 1977.— P. 3—16.
5. Price H. J., Smith R. H., Grumbles R. M. Callus cultures of six species of cotton (*Gossypium L.*) on defined media // Plant Sci. Lett.— 1977.— N 10.— P. 115—119.
6. Биотехнология сельскохозяйственных растений.— М.: Агропромиздат, 1987.— 301 с.

Ин-т эксперим. биологии растений Получено 19.10.88
 АН УзССР, Ташкент
 Ташкент. гос. ун-т им. В. И. Ленина
 Ин-т химии растит. веществ АН УзССР, Ташкент

COMPARATIVE ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES IN CELL AND TISSUE CULTURE OF COTTON *GOSSYPIUM ARBOREUM L.*

A.-K. E. Ergashev, O. Ya. Vesmanova, U. K. Najimov,
 A. M. Rashkes, Ya. V. Rashkes

Institute of Experimental Biology of Plants,
 Academy of Sciences of the Uzbek SSR
 V. I. Lenin State University, Tashkent
 Institute of Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Uzbek SSR

Summary

Callus culture was obtained from the explants of hypocotyl of cotton *G. arboreum L.*, cell suspension was obtained from the callus culture. Secondary metabolites in the obtained cell and tissue cultures were comparatively analyzed and identified. The obtained cell

and tissue cultures were rich in stigma sterol, fucosterol, esters of steroids and triterpenoids as well as in admixture of amirine and possibly ubiquinone-9. Secondary metabolites synthesized in the cell suspension of cotton are of interest in connection with the possibility to use suspension in biotechnology for obtaining different biologically active substances or their sum in specific proportions.

УДК 581.343.6:633.511

О. Я. Весманова, С. Н. Зуева, А.-К. Э. Эргашев

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОК КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ХЛОПЧАТНИКА

*Изучены цитологические особенности ткани хлопчатника вида *Gossypium arboreum* L., культивируемой *in vitro*. Проведен анафазный анализ хромосомных нарушений при длительном культивировании ткани. Изучены спектры хромосомных чисел и их изменение в ранних и последующих пассажах культивирования.*

Введение. Каллусная ткань хлопчатника вида *Gossypium arboreum* L. была впервые получена в работе [1]. Изучение действия различных регуляторов роста в культуре данного вида проводилось ранее [2].

В литературе показано, что для большинства культур клеток растений *in vitro* характерна генетическая гетерогенность, высокая хромосомная изменчивость [3—7]. При длительном культивировании меняется спектр хромосомных чисел клеток, морфология хромосом и т. д. [8, 9]. Однако сравнительные цитогенетические особенности клеток ткани хлопчатника *in vitro* и *in vivo* изучены крайне слабо. Целью данного исследования явилось изучение цитогенетических особенностей гипокотильного каллуса *G. arboreum* L. при длительном культивировании.

Материалы и методы. Каллусную ткань получали из отрезков гипокоты стерильных проростков *G. arboreum* var. *salvianum* L. Проростки и ткани культивировали при люминесцентном освещении лампами дневного света (3,5 клк, фотопериод 16 ч) и температуре 30 ± 2 °С. Среда для индукции каллусогенеза и дальнейшего культивирования состояла из минеральной части по Мурасиге-Скугу, инозита (100 мг/л), тиамина·HCl (0,4 мг/л), глюкозы (3 %), агар-агара (0,75 %), рН 5,7, α -нафтилуксусной кислоты (НУК, $1 \cdot 10^{-6}$ М), N-фенил-N-(1, 2, 3-триазазол-5) мочевины (дефолиант «дропп» фирмы «Schering», ФРГ, $1 \cdot 10^{-6}$ М).

Ткани исследовали в течение 16 пассажей культивирования. Фиксацию (в фиксаторе Кларка) производили на 21-й день культивирования каждого пассажа. В качестве красителя использовали ацетожелезогематоксилин. Изменения генома анализировали мета- и анафазными методами при увеличении $60 \times 10 \times 2,5$ и $90 \times 10 \times 2,5$.

*Анафазный анализ хромосомных нарушений в ткани хлопчатника вида *G. arboreum* L.
Anaphase analysis of chromosomal breach in tissue of cotton species *G. arboreum* L. during*

Пассаж	Количество изученных клеток	Клетки с абберациями		Типы хромосомных			
		Число	% $\pm m$	Отстающие хромосомы	Множественные отстающие хромосомы	Делеции	Множественные делеции
1-й	515	41	7,96 \pm 1,19	1,55	1,36	1,36	0,39
2-й	700	71	10,14 \pm 1,14	2,14	1,29	1,43	1,43
3-й	639	62	9,70 \pm 1,17	2,82	0,94	1,56	1,25
11-й	597	85	14,24 \pm 1,43	2,18	1,68	1,01	0,67
Контроль	1178	29	2,46 \pm 0,45	0,61	0,09	0,35	0,26

Примечание. Контролем служили клетки меристемной ткани растений. Разница с