

## ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ САПОНИНОВ И ЭКДИСТЕРОИДОВ В РАСТЕНИЯХ: ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОДЫ

© 2010 Д.М. Шадрин<sup>1</sup>, Я.И. Пылина<sup>1</sup>, А.В. Родионов<sup>2</sup>, С.О. Володина<sup>1</sup>,  
К.Г. Ткаченко<sup>2</sup>, В.В. Володин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, г. Сыктывкар

<sup>2</sup> Ботанический Институт им. В.Л. Комарова РАН г. Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 27.04.2010

С использованием хемотаксономического и молекулярно-филогенетического подходов изучено распределение стероидных и тритерпеновых гликозидов в сем. *Fabaceae* Lindl. и экдистероидов в сем. *Asteraceae*. Установлено, что большинство представителей сем. *Fabaceae* содержат тритерпеновые гликозиды, стероидные гликозиды обнаружены только у некоторых филогенетически обособленных таксонов в трибах Loteae, Thermopsidae и Trifolieae. Выявлены существующие филогенетические связи между видами сем. *Asteraceae*, у которых экдистероиды, возможно, выполняют экологическую роль. Разработан научно обоснованный прогноз поиска ресурсных видов растений – продуцентов вторичных метаболитов мевалонатного пути биосинтеза сапонинов и экдистероидов.

Ключевые слова: *стероидные гликозиды, тритерпеновые гликозиды, экдистероиды, хемотаксономия, молекулярная филогения*

Исследование распространения отдельных групп вторичных метаболитов по системе растений имеет важное научное и практическое значение для поиска перспективных продуцентов биологически активных соединений и понимания функций вторичных метаболитов в растениях. Считается, что вторичные метаболиты играют жизненно важную роль в качестве защитных факторов или сигнальных молекул во взаимоотношениях растений с другими организмами. Их наличие (отсутствие) отражает адаптационную стратегию видов в процессе эволюции. В ряде случаев для установления филогенетического родства растений – продуцентов вторичных метаболитов, недостаточно существующих систем классификаций. В последнее время в этих целях, наряду с системами, основанными на морфолого-анатомических признаках, применяют молекулярно-генетические методы, основанные на сравнении последовательностей ДНК. Ранее в рамках международного

проекта INTAS с участием нашей лаборатории была сделана попытка построения молекулярно-филоге-нетического древа сем. *Caryophyllaceae* [1]. Более обширные исследования на основе хемотаксономического и молекулярно-филогенетического подходов в изучении распределения алкалоидов и непротеиногенных аминокислот на примере сем. *Fabaceae* были проведены Винком [2].

Настоящая работа направлена на выявление связей между распространением двух биогенетически близких групп вторичных метаболитов, связанных общим мевалонатным путем биосинтеза – сапонинов (на примере сем. *Fabaceae*) и экдистероидов (на примере трибы Cardueae, сем. *Asteraceae*) и филогенетической классификацией растений, что позволит оценить их значимость в качестве хемотаксономических маркеров.

Для определения изучаемых нами вторичных метаболитов растений использованы известные экспрессные физико-химические и биологические методы тестирования растений (сапонины): способность к пенообразованию, гемолизу эритроцитов, а также ТСХ- и ВЭЖХ-хроматография. Для установления тонкой структуры соединений использовали методы масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для выявления закономерностей распространения сапонинов и экдистероидов реконструирована молекулярная филогения сем. *Fabaceae* и трибы Cardueae, сем. *Asteraceae*. При проведении анализа близкородственных таксонов использовали последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 из

Шадрин Дмитрий Михайлович, аспирант. E-mail: shdima@ib.komisc.ru

Пылина Яна Игоревна, аспирантка. E-mail: pylina@ib.komisc.ru

Родионов Александр Викентьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии. E-mail: avrodionov@mail.ru

Володина Светлана Олеговна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии. E-mail: volodina@ib.komisc.ru

Ткаченко Кирилл Гаврилович, кандидат биологических наук, руководитель группы Интродукции полезных растений и семеноведения. E-mail: kigatka@gmail.com

Володин Владимир Витальевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии и биотехнологии. E-mail: volodin@ib.komisc.ru

базы данных GenBank. Последовательности генов выравнивались вручную и с помощью программы ClustalW, входящей в пакет программ MEGA 4. Нами использованы два метода: метод максимальной парсимонии и метод объединения ближайших соседей. Генетические расстояния рассчитывались исходя из модели Kimura-2. Данная модель успешно используется для анализа близкородственных таксонов [3].

На содержание тритерпеновых (ТГ) и стероидных гликозидов (СГ) исследовано 93 образца 46 видов растений из 14 родов (см. табл.). Установлено, что подавляющее большинство изучаемых видов содержит тритерпеновые

гликозиды. Стероидные гликозиды обнаружены у представителей родов *Trigonella* (триба Trifolieae), *Thermopsis* (триба Thermopsidae) и *Coronilla* (триба Loteae). Распределение сапонинов двух классов, стероидных и тритерпеновых часто является взаимоисключающим, что может указывать на более экономичное использование защитных ресурсов растений. Тем не менее, в литературе имеются сведения о том, что вид *Vicia tenuifolia* L. содержит и тритерпеновые, и стероидные гликозиды [4]. Указанный выше факт требует дополнительных исследований, доказывающих возможность одновременного присутствия двух типов сапонинов в растениях.

**Таблица.** Распространение сапонинов в сем. *Fabaceae* Lindl.

Таксон	Литературные данные			Экспериментальные данные			
	общее кол-во видов	содержат:		общее кол-во видов	содержат:		
ТГ		СГ	сумма		ТГ	СГ	
Триба Hedysareae							
род Hedysarum L.	6	3	-	3	2	2	-
род Onobrichus Hill.	1	-	-	1	4	4	-
Триба Loteae							
род Anthyllis L.	2	1	1	-	1	1	-
род Coronilla	1	-	1	-	1	-	1
Триба Tripholeae							
род Medicago L.	9	9	-	-	3	3	-
род Melilotus L.	2	1	1	-	2	2	-
род Tripholium L.	4	3	-	1	9	9	-
род Trigonella L.	5	-	4	1	2	-	2
род Ononis L.	4	-	-	4	-	-	-
Триба Genisteae							
род Lupinus L.	1	1	-	-	1	1	-
род Chamaecytisus Link.	1	-	-	1	-	-	-
Триба Phaseoleae							
род Phaseolus L.	1	1	-	-	1	1	-
род Glicine Willd	1	1	-	-	-	-	-
Триба Galegeae							
род Astragalus L.	24	13	-	11	4	4	-
род Caragana Fabr	4	1	-	3	1	1	-
род Galega L.	2	-	-	2	-	-	-
род Glycyrriza L.	4	4	-	-	-	-	-
род Halimadendron DC.	1	-	-	1	-	-	-
род Oxitropis DC.	9	9	-	-	2	2	-
Триба Viciaeae							
род Lathyrus L.	1	1	-	-	4	4	-
род Vicia L.	8	8	1	-	4	4	-
род Pisum L.	1	1	-	-	1	1	-
Триба Thermopsidae							
род Thermopsis R.Br.	1	-	-	1	3	-	3
род Baptisia	1	1	-	-	2	2	-
Сумма	94	58	8	29	47	41	6

Наличие стероидных гликозидов в трибе Trifolieae в роде *Trigonella* и у вида *Melilotus tauricus* [5], в трибе Loteae в роде *Coronilla* и у вида *Anthyllis macrocephala* [6], а в трибе Thermopsidae – только в роде *Thermopsis*, но не у других представителей этой трибы. Это

позволило заметить, что в сем. *Fabaceae* стероидные гликозиды присущи видам и родам, не связанным монофилитическими отношениями на уровне триб, к которым они принадлежат (рис. 1) и обнаружены только у некоторых филогенетически обособленных таксонов

в трибах Loteae, Thermopsidae и Trifolieae. При этом в трибе Trifolieae, как указано выше, стероидные гликозиды обнаружены только в двух родах (*Trigonella* и *Melilotus*), которые на молекулярно-филогенетической кладограмме образуют отдельную кладу, обособленную от других представителей этой трибы, что в свою очередь отражает эволюцию этих

таксонов. На данном этапе исследования выявленная нами закономерность не может быть истолкована однозначно. С одной стороны, ее можно объяснить тем, что гены, кодирующие биосинтез ферментов, ответственных за синтез стероидных гликозидов, были приобретены в процессе эволюции в нескольких таксонах, не зависимо друг от друга.

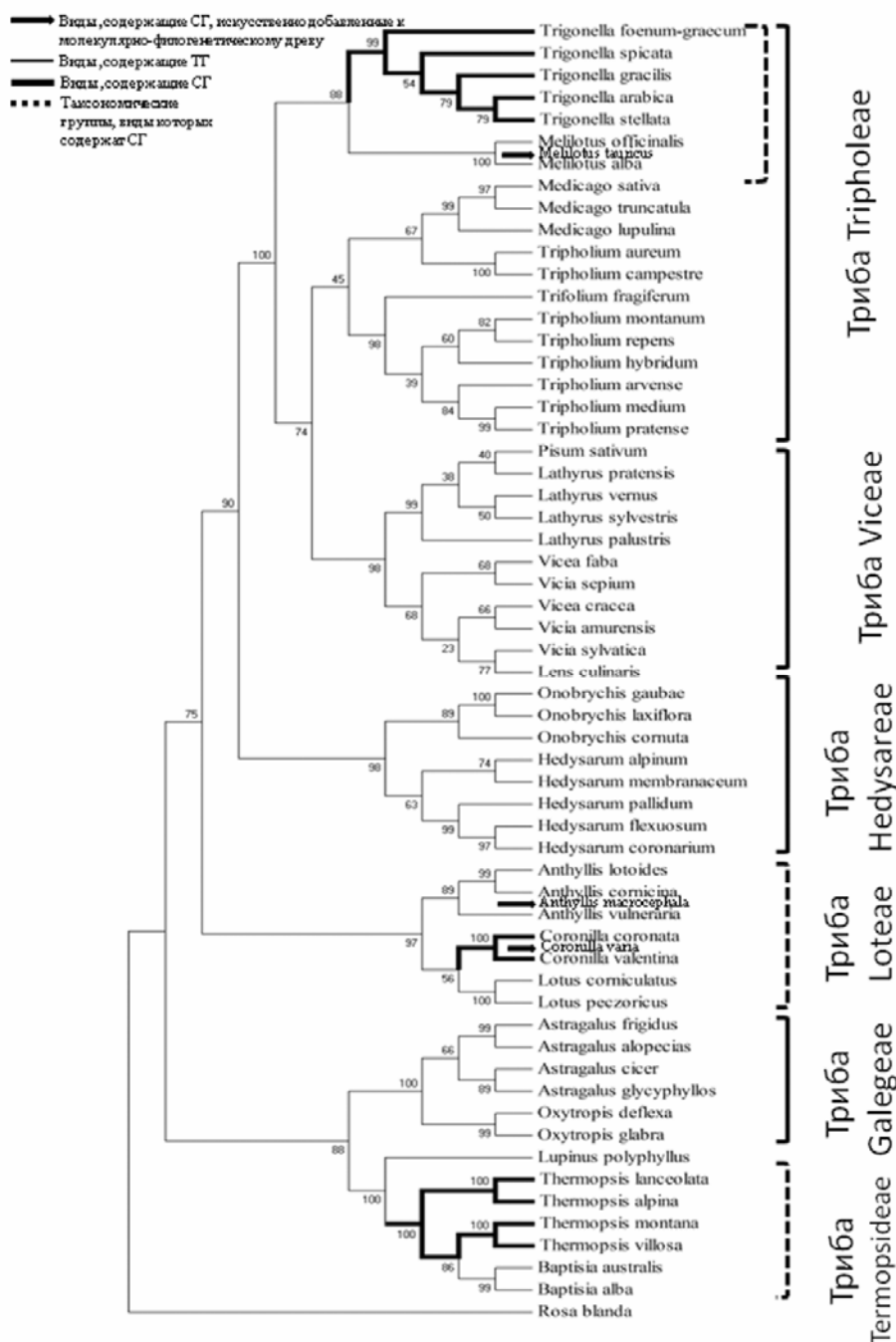


Рис. 1. Филогенетическое дерево растений сем. *Fabaceae* Lindl.

С другой стороны, не исключается гипотеза о том, что эти гены, были приобретены на ранних этапах эволюции цветковых растений, однако их экспрессия происходит только в определенных таксонах, что находит свое отражение и на уровне изучаемого семейства.

Установленный факт, что тритерпеновые гликозиды являются характерными для подавляющего числа видов наследственных Caesalpinioideae /Mimosoideae и большинства триб Papilionoideae, куда входят исследованные нами виды, указывает на генетическую предрасположенность видов сем.

*Fabaceae* к биосинтезу сапонинов именно этой группы.

Закономерности распространения тритерпеновых и стероидных гликозидов среди представителей сем. *Fabaceae* использованы нами для составления хемотаксономического прогноза их обнаружения во флоре Европейского Северо-Востока России. Таким образом, большинство видов флоры содержит тритерпеновые гликозиды, стероидные гликозиды можно искать в ограниченных таксонах, указанных выше. Ранее считалось, что не существует связи между распространением экдистероидов и филогенетической классификацией растений, поскольку экдистероиды встречаются как в филогенетически близких, так и удаленных семействах. Внутри семейств и даже внутри родов могут встречаться как экдистероидсодержащие, так и лишенные этих соединений виды [7]. Работами сотрудников лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии было показано, что биохимический признак наличия экдистероидов на внутрисемейственном уровне закреплен в трибах, хотя эта закономерность и не носит абсолютного характера. Сказанное относится к концентрациям экдистероидов в растениях, обнаруживаемым с помощью биотеста на культуре клеток *Drosophila melanogaster* (т.е. гормонально-

активным концентрациям по отношению к насекомым). При этом оказалось, что следовые количества экдистероидов, не активные в биотесте, но обнаруживаемые с помощью радиоиммунного анализа в концентрации менее 4 мкг/г содержат едва ли не все виды растений. Это свидетельствует о том, что гены, кодирующие ферменты биосинтеза экдистероидов присутствуют у всех растений, но их выраженная экспрессия происходит только в группах близкородственных видов, ограниченных определенными родами и трибами, в которых, по видимому, экдистероиды выполняют экологическую функцию.

В сем. *Asteraceae*, насчитывающем по разным источникам 20-25 тыс. видов, экдистероиды обнаружены только у представителей трибы *Cardueae*. На основании данных GenBanka нами было построено молекулярно-филогенетическое древо трибы *Cardueae* подсемейства *Lactucoideae*. Эта триба включает две подтрибы *Carduinae* (B), виды которой содержат экдистероиды только в следовых количествах, и *Centaureinae* (A), которая, по данным В.В. Володина и И.Ф. Чадина, включает виды с экологически значимой концентрацией, т.е. «положительные» в биотесте (рис. 2) [8].

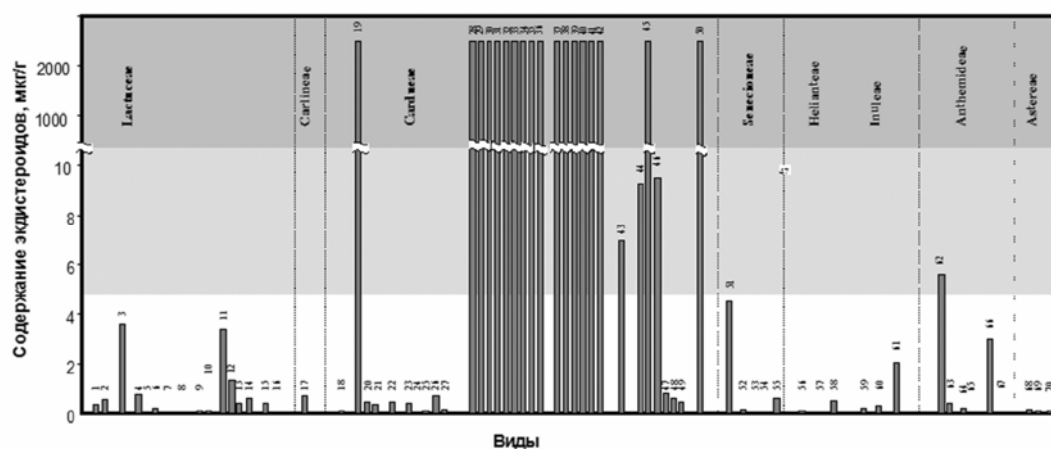


Рис. 2. Распространение экдистероидов в семействе *Asteraceae*:

темная окраска – высокие концентрации, обнаруживаются традиционными методами (положительный ответ в биотесте); более светлая окраска – умеренные концентрации; светлое поле – низкие концентрации, обнаруживаются РИА (отрицательный ответ в биотесте)

**LACTUCOIDEAE: Lactuceae:** 1 -*Hieracium sibiricum*, 2 -*H. umbellatum*, 3 -*Leontodon autumnalis*, 4 -*Picris hieracioides*, 5 -*P. hieracioides*, 6 -*P. umbellatum*, 7 -*P. umbellatum*, 8 -*Scorzonera humilis*, 9 -*Lactuca sativa*, 10 -*L. tatarica*, 11 -*Crepis paludosa*, 12 -*C. praemorsa*, 13 -*C. sibirica*, 14 -*C. tectorum*, 15 -*Taraxacum officinale*, 16 -*Sonchus asper*, **Carlinae:** 17 -*Carlina sp.* **Cardueae: Carduinae** 18 -*Arctium tomentosum*, 19 -*Saussurea latifolia*, 20 -*S. alpina*, 21 -*S. parviflora*, 22 -*Carduus nutans*, 23 -*Cirsium heterophyllum*, 24 -*C. oleraceum*, 25 -*C. palustre*, 26 -*C. setosum*, 27 -*C. vulgare*, **Cardueae: Centaurineae:** 28 -*Serratula algida*, 29 -*S. centauroides*, 30 -*S. coronata*, 31 -*S. inermis*, 32 -*S. lyratifolia*, 33 -*S. procumbens*, 34 -*S. quinquefolia*, 35 -*S. sogdiana*, 36 -*S. xeranthemoides*, 37 -*Rhaponticum carthamoides*, 38 -*Rh. integrifolium*, 39 -*Rh. karatavicum*, 40 -*Rh. lyratum*, 41 -*Rh. nitidum*, 42 -*Rh. pulchrum*, 43 -*Acroptilon repens*, 44 -*Centaurea scabiosa*, 45 -*C. rothrockii*, 46 -*C. phrygia*, 47 -*C. americana*, 48 -*C. jacea*, 49 -*C. fischeri*, 50 -*Amberboa moschata*; **ASTEROIDEAE: Senecioneae:** 51 -*Ligularia sibirica*, 52 -*Petasites spurius*, 53 -*Cacalia hastata*, 54 -*Senecio nemoriensis*, 55 -*S. vulgaris*; **Heliantheae:** 56 -*Bidens cernua*, 57 -*B. tripartita*, 58 -*Ambrosia sp.*; **Inuleae:** 59 -*Anthemis dioica*, 60 -*Omalotheca sylvaticum*, 61 -*Inula salicina L.* **Anthemideae:** 62 -*Achillea millefolium*, 63 -*A. ptarmica*, 64 -*Matricaria recutita*, 65 -*M. suaveolens*, 66 -*Leucanthemum vulgare*, 67 -*Artemisia campestris*; **Astereae:** 68 -*Solidago virgaurea*, 69 -*Erigeron acris*, 70 -*E. canadensis*

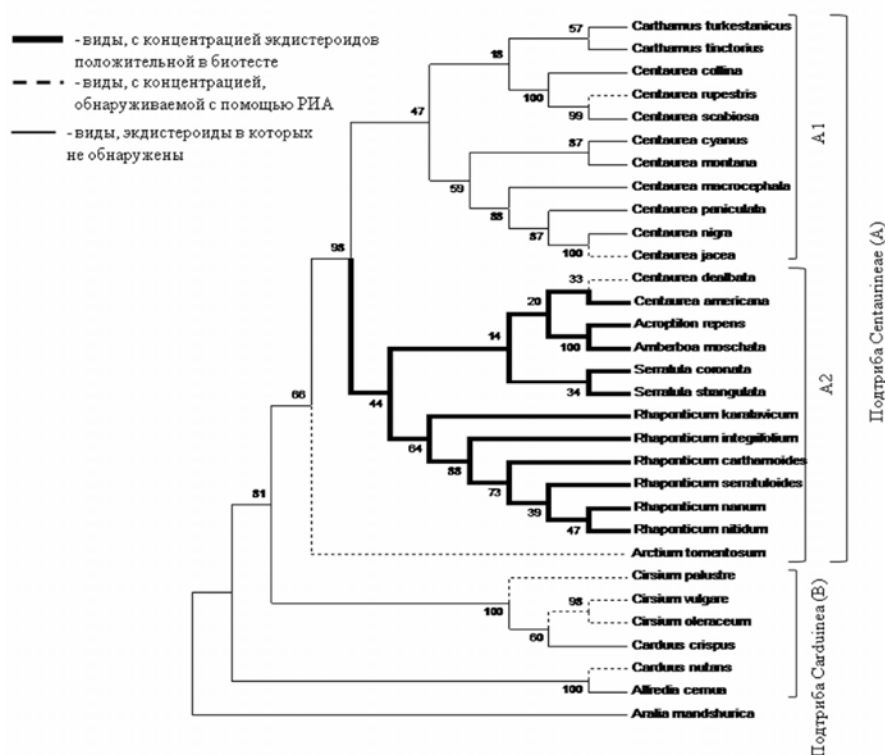


Рис. 3. Филогенетическое древо растений трибы Cardueae сем. Asteraceae Dumort.

Подтриба Centaureinae образует обособленную кладу, включающую две подклады (A1 и A2) с высоким коэффициентом Бутстрепа (рис. 3). Следует отметить, что виды, давшие отрицательную реакцию в биотесте, представлены двумя родами *Carthamus* и *Centaurea* и образуют подкладу A1. На молекулярно-филогенетическом древе подкладу A2 образовали виды, давшие положительную реакцию в биотесте и представленные пятью родами: *Rhaponticum*, *Acroptilon*, *Amberboa*, *Serratula*, *Centaurea*. Причем в роде *Centaurea* из 11 исследованных видов – только у представителя *C. americana*. Другой из исследованных Саркером и Дайнаном в этом роде вид *Centaurea moschata*, в котором было обнаружено высокое содержание экдистероидов [9], по флоре СССР, считается видом другого рода - *Amberboa moschata*, филогенетически близкого роду *Acroptilon*. Исходя из данного замечания, уже не кажется неожиданным обнаружение высокой концентрации экдистероидов как в образцах растений *Acroptilon repens*, так и в *Amberboa moschata*. Полученные данные соответствуют представлению M. Dittich (1977 год) о разделении на основании палинологических, морфологических и анатомических признаков подтрибы Centaureinae на группы родов, согласно которому *Acroptilon* входит в одну группу с родами *Rhaponticum* и *Serratula*, а роды *Carthamus* и *Centaurea* относятся к другой группировке родов [10]. В свою очередь, на построенном нами молекулярно-филогенетическом древе представители родов *Acroptilon* и *Amberboa* имеют

общего, предположительно, экдистероидсодержащего предка. Следовательно, данные распространения фитоэкдистероидов в сочетании с методами молекулярной филогении позволяют выявить существующие филогенетические связи между видами, у которых экдистероиды, возможно, выполняют экологическую роль.

**Выводы:** использование хемотаксономического и молекулярно-филогенетического подходов позволило изучить закономерности распространения двух классов вторичных метаболитов в растениях и оценить их значимость в качестве хемотаксономических маркеров и разработать научно обоснованный прогноз поиска ресурсных видов растений – продуцентов вторичных метаболитов мевалонатного пути биосинтеза сапонинов и экдистероидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России, оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» (проект «Состояние ресурсов полезных растений европейского Северо-Востока России: мониторинг и разработка биотехнологических подходов по рациональному использованию и воспроизводству»).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae / L. Zibareva, V. Volodin et al. // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 499-517.
2. Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 3-19.

3. *Nei, M.* Molecular Evolution and Phylogenetics / *M. Nei, S. Kumar.* – NY: Oxford University Press, 2000. – 333 p.
4. *Куваев, И.Б.* Предварительная химическая оценка лекарственных растений тибетской медицины, произрастающих в Забайкалье / *И.Б. Куваев, К.Ф. Блинова* // Вопросы фармакогнозии. – 1961. – Вып. 1. – С. 213-262.
5. Triterpene and steroid saponins isolated from two *Melilotus* species / *Khodakov, G.V., Akimov, Y.A., Shashkov, A.S., et al.* // Adv-Exp-Med-Biol. – 1996. – P. 405211-40522.
6. *Галкин, М.А.* Дикорастущие полезные растения Северного Кавказа / *М.А. Галкин, А.Л. Казаков.* – Ростов-на-Дону, 1980. – 128 с.
7. *Lafont, R.* Phytoecdysteroids: structures, occurrence, biosynthesis and possible ecological significance / *R. Lafont, A. Bouthier, I.D. Wilson* // Conf. Insect Chem. Ecol.: Programme and Abstracts. – Tabor, 1991. – P.197-214.
8. Фитоэктистероиды / Под ред. *В.В. Володина.* – СПб: Наука, 2003. – 293 с.
9. Occurrence of Ecdysteroids in the Genus *Centaurea* (Compositae): 20-Hydroxyecdysone from *Centaurea moschata* / *S. Sarker, L. Dinan et al.* // Biochemical Systematics and Ecology. – 1997. – Vol. 25. – P. 367-368.
10. *Dittrich, M.* Cynareae-systematic review // The biology and chemistry of Compositae / *Eds V.H. Heywood, I.B. Harborne, B.L. Turner.* – London, 1977. – P. 999-1015.

## REGULARITIES OF SAPONINS AND ECDYSTEROIDS DISTRIBUTION IN PLANTS: CHEMOTAXONOMICAL AND MOLECULAR PHYLOGENIC APPROACHES

© 2010 D.M. Shadrin<sup>1</sup>, Ya.I. Pylina<sup>1</sup>, A.V. Rodionov<sup>2</sup>, S.O. Volodina<sup>1</sup>, K.G. Tkachenko<sup>2</sup>,  
V.V. Volodin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology Komi Scientific Centre UB RAS, Syktyvkar

<sup>2</sup> Botanical Institute named after V.L. Komarov RAS, St.-Petersburg

With the use of chemotaxonomical and molecular-phylogenetic approaches distribution of steroid and triterpenic glycosides in family *Fabaceae* Lindl. and ecdysteroids in family *Asteraceae* is studied. It is established, that the majority of representatives family *Fabaceae* contain triterpenic glycosides, steroid glycosites are found out only in the some phylogenetic isolated taxons in tribes Loteae, Thermopsidae and Trifolieae. Existing phylogenetic communications between kinds of family *Asteraceae* are revealed, at which ecdysteroids, probably, carry out an ecological role. Scientifically proved forecast of search the resource kinds of plants - producers of secondary metabolites of mevalonant ways of saponines and ecdysteroids biosynthesis are developed.

Key words: *steroid glycosites, triterpenic glycosites, ecdysteroids, chemotaxonomia, molecular phylogenia*

---

*Dmitriy Shadrin, Post-graduate Student. E-mail: shdima@ib.komisc.ru*  
*Yana Pylina, Post-graduate Student. E-mail: pylina@ib.komisc.ru*  
*Alexander Rodionov, Doctor of Biology, Chief of the Laboratory of Biosystematics and Cytology. E-mail: avrodionov@mail.ru*  
*Svetlana Volodina, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology. E-mail: volodina@ib.komisc.ru*  
*Kirill Tkachenko, Candidate of Biology, Head of the Effective Plants and Seed-growing Group. E-mail: kigatka@gmail.com*  
*Vladimir Volodin, Doctor of Biology, Chief of the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology. E-mail: volodin@ib.komisc.ru*