

## Генотипирование лекарственного растения *Codonopsis clematidea* (Shrenk) Clark, произрастающего на территории Юго-Восточного Казахстана

Каирова М.Ж.

Республиканская коллекция микроорганизмов НЦБ КН МОН РК, Астана

Мақалада Қазақстанның Оңтүстік және Шығыс аймақтарында өсетін шипагерлік *Codonopsis clematidea* (Shrenk) Clark өсімдікті зерттеу жүргізу қажеттігі көрсетілді. Бұл *C. clematidea* (Shrenk) Clark өсімдігі алғашқы рет секвенстеу әдісімен ДНК-ның ішкі транскрипті орны (ITS) арқылы генотиптеліп, пайда болған секвенс GenBankпен салыстырылды.

In the article perspectives of studying of medical plant of *C. clematidea* (Shrenk) Clark are shown which is growing in South-Eastern region of Kazakhstan. First time the genotyping of *C. clematidea* (Shrenk) Clark are applied that is based on the sequencing of an internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA (rDNA) and a comparative analysis is conducted through GenBank data base.

Семейство *Campanulaceae* Juss. распространено во всем мире и включает большое количество известных лекарственных растений, таких как *Platycodon grandiflorum*, *Codonopsis pilosula* и *Adenophora triphylla*. По одним данным это семейство состоит из 50 родов и 800 видов [1–2], а согласно другим источникам — из 40 родов и 600 видов [3] или же из 87 родов и 1950 видов [4]. Такое значительное разногласие среди литературных данных связано с несоответствием всех предыдущих классификаций семейства *Campanulaceae* Juss. Более того, нет общего мнения о границе рода, а также в более высших рангах среди главных подразделов семейства. Таксономические проблемы данного семейства могут быть объяснены тем фактом, что все эти ранние классификации имеют более географическую, чем биологическую основу [5].

Виды семейства *Campanulaceae* Juss., несмотря на их количество и значение во флоре с умеренным климатом, остаются недостаточно изученными [5]. В Казахстане насчитывается 20 видов растений из этого семейства [6].

Одними из перспективных растений этого семейства являются растения рода Кодонописис (*Codonopsis* Wall.). Во флоре СССР [7] указывается, что виды Кодонописиса произрастают на Дальнем Востоке и в горах Центральной Азии. В Казахстане единственным представителем данного рода является Кодонописис ломоносовидный (*C. clematidea* (Shrenk) Clark), произрастающий в горах Тянь-Шаня, Памир-Алае и Джунгарском Алатау [8].

Некоторые виды Кодонописиса издревле используются в народной медицине, например, *C. clematidea* — азиатский колокольчик «tang-sheng» [3] или корень «Dangshen» [9] в китайской медицине известен как заменитель дорогостоящего корня женьшеня (*Panax ginseng*) и до сих пор применяется в Китае, Японии и Корее при повышенном кровяном давлении, заболеваниях сердца, при быстрой утомляемости, для укрепления иммунной системы, снижения артериального давления и улучшения аппетита. Благодаря широкому изучению химического состава корнеплодов Кодонописиса выявлены новые алкалоидные и флавоноидные соединения, тритерпеноиды, сапонины и полиацетиленовые вещества [9–10]. Кроме того, в традиционной медицине Узбекистана при лечении болезней печени используется и надземная часть растений *C. clematidea* [11]. Алкалоиды кодонописин и кодонописинин, выделенные из растений *C. Clematidea*, являются низкотоксичными соединениями и обладают широким спектром фармакологического действия, желчегонный эффект которых в два раза выше, чем у часто используемых в медицине берберина и флавина. В настоящее время большое количество препаратов, основанных на кодонописине, применяется для профилактики и лечения болезней печени и желчного пузыря, а также токсического гепатита.

В основном корень Dangshen получают из трех видов Кодонописиса: *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf., *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L.T.Shen или *C. tangshen* Oliv. [12]. Однако другие пять видов *C. tubulosa* Kom., *C. subglobosa* W.W.Smith, *C. clematidea* (Shrenk) Clark, *C. canescens* Nannf. и *C. lanceolata* (Sieb. et Zucc.) Trautv. также могут являться заменителями лекарственного корня Кодонописиса [9].

В Китае водный горячий экстракт из корней *C. lanceolata* стал применяться более тысячи лет назад при лечении мужской половой стерильности и импотенции, а также использовался как пищевая

добавка в различные блюда. Недавно было показано, что биологически активные компоненты *C. lanceolata* обладают антиоксидантным [13] и цитотоксическим действием против раковых клеток [14]. Корнеплоды растений *C. tangshen* Oliv., или Chuan–Danshen, также хорошо известны в традиционной китайской медицине тем, что иногда используются как заменители корня женьшеня и обладают тонизирующим действием [15]. *C. pilosula* (Franch.) Nannf. применяется в китайской народной медицине при диспепсии, бронхитах, кашле, спазмах и воспалениях, а также используется в пищу [16].

Однако известны случаи отравления при применении недоброкачественных растительных препаратов и добавок, что, в свою очередь, привело к волне исследовательских работ с применением молекулярно-генетических методов анализа с целью быстрой идентификации образцов растительного происхождения [17]. На сегодняшний день одним из популярных методов при идентификации, генотипировании и изучении филогенетического родства между различными видами является метод секвенирования ДНК.

Известно, что различные регионы генома эволюционируют с различной скоростью, что пригодно при идентификации разных таксономических уровней. Регионы, не кодирующие белки, находятся под меньшим селективным давлением, хотя иногда могут иметь более вариабельные участки. По этим вариабельным участкам возможна дифференциация различных близкородственных организмов. Так, общеиспользуемыми при секвенировании локусами генома являются гены, кодирующие рибосомальную РНК (*rDNA*), и гены, находящиеся в митохондриальной и хлоропластной ДНК. Проведена расшифровка нуклеотидных последовательностей *rDNA* растений, используемых в китайской медицине, таких как виды *Panax species*, *Eucommia ulmoides* (*Duzhong*), *Cordyceps* (*Dongchongxiacao*) *species*, *Dendrobium* (*Shihu*) *species*, *Myospalax baileyi* и *Ligusticum chuanxiong* (*Chuanxiong*). Кроме того, ряд авторов с целью молекулярно-филогенетического исследования всего семейства *Campanulaceae* указывают на секвенирование внутреннего транскрибируемого участка (*internal transcribed spacer* (*ITS*)) рибосомальной ДНК (*rDNA*), интронной части генов *matK/trnK* [18], а также хлоропластной ДНК (*cpDNA*) [19]. Результаты секвенирования участков *ITS*I и *ITS*II *rDNA* четырех видов *Codonopsis* Wall. показали высокую гомологию, но не идентичность [20].

Исходя из изложенного выше можно говорить о перспективности и актуальности изучения популяции *C. clematidea* (Shrenk) Clark, произрастающей в юго-восточных регионах Казахстана, тем более, что работы по его генотипированию у нас не проводились. В связи с этим целью данной работы являлись генотипирование казахстанской популяции *C. clematidea* (Shrenk) Clark для создания и пополнения собственной базы данных о нуклеотидных последовательностях ДНК лекарственных растений Казахстана на основе секвенирования внутреннего транскрибируемого участка (*internal transcribed spacer* (*ITS*)) *ITS*I и *ITS*II рибосомальной ДНК (*rDNA*) и сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности с референсными последовательностями через базу данных GenBank.

#### Материалы и методы

Образцы растений *C. clematidea* (Shrenk) Clark собраны в Аксайском ущелье Алма-Атинской области.

Выделение ДНК проводилось по СТАВ-методу [21] с некоторыми модификациями. Измерение концентрации выделенной ДНК было проведено на приборе NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Аmplификация проводилась с использованием специфичных к региону *ITS*I и *ITS*II праймеров: forward *ITS*I и reverse *ITS*IV (Синтол, Россия), любезно предоставленных лабораторией клеточной селекции и биотехнологии НЦБ КН МОН РК. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) проведена на приборе DNA Engine Tetrad 2 Cyclor (Bio-Rad, США). Реакционная смесь состояла: 10 × раствор dNTPs (2 mmol/l каждого нуклеотида) 2,5 µl, 10 × ПЦР буфер 2,5 µl, ДНК мишень (0,02 µg/µl) 5 µl, Taq ДНК полимеразы 1U, 10 pmol/µl праймеры по 0,5 µl. Общий объем смеси доведен до 25 µl водой, свободной от нуклеаз. Температурные условия амплификации следующие: предденатурация при 95°C в течение 5 мин, денатурация при 95°C 30 сек, отжиг при 55°C 1 мин и элонгация при 72°C 1 мин. Всего режим амплификации состоял из 35 циклов. Последняя элонгация проводилась при 72°C в течение 7 мин. Для визуализации ПЦР-продуктов проведен электрофорез в 2 %-ном агарозном геле при 120 V.

Элюированные из геля и очищенные ПЦР-продукты были секвенированы с помощью набора BigDye terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, США) на приборе 3730 DNA analyzer

(Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Анализ результатов секвенирования осуществлен с использованием программы Vector NTI Advance 10 и базы данных GenBank NCBI. Построение дендрограммы проведено с помощью метода Neighbor Joining. Все эксперименты проведены в 2–3 повторностях.

### Результаты

На электрофореграмме (рис.1) видно, что длина продукта амплификации составляет  $\approx 750$  пар нуклеотидов (п.н.).

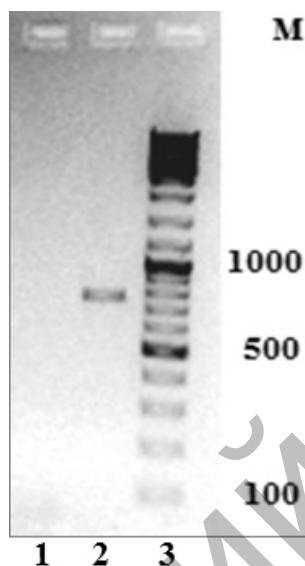


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации в 2 %-ном агарозном геле: 1 — негативный контроль ( $H_2O$ ); 2 — ПЦР-продукт длиной  $\approx 750$  п.н.; 3 — маркеры молекулярного веса, п.н.

Рисунок 2 демонстрирует часть нуклеотидной последовательности ITS региона *rDNA*, полученной при ПЦР с праймером forward ITS1.

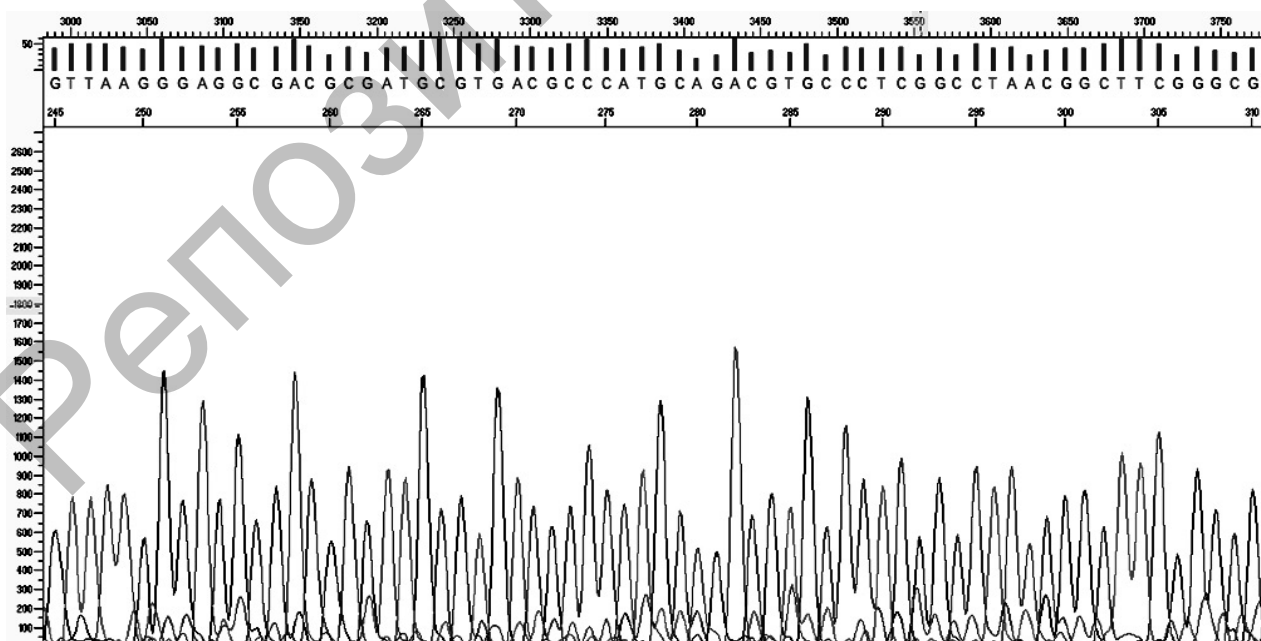


Рис. 2. Хроматограмма нуклеотидной последовательности ITS региона *rDNA* растений *C. clematidea*

Сравнительный анализ, проведенный через базу данных GenBank (см. табл.), показал, что полученная нуклеотидная последовательность ITS I и ITS II регионов *rDNA* растений *C. clematidea* идентична на 97 % секвенсам следующих видов: *C. kawakamii*, *C. tangshen*, *C. pilosula* и *C. pilosula var. modesta*, а также видам *C. lanceolata* и *C. javanica subsp. japonica* с идентичностью на 93 и 89 % соответственно.

Т а б л и ц а

Результаты сравнения нуклеотидной последовательности ITS региона *rDNA* *C. clematidea* с базой данных GenBank NCBI

Наименование объекта исследований	Регистрационный номер образца в GenBank	Видовое наименование образца, зарегистрированного в GenBank	Идентичность, %
<i>Codonopsis clematidea</i>	<a href="#">DQ810274.1</a>	<i>Codonopsis kawakamii</i>	97
	<a href="#">GQ906566.1</a>	<i>Codonopsis tangshen</i>	97
	<a href="#">FJ572048.1</a>	<i>Codonopsis pilosula</i>	97
	<a href="#">EF190461.1</a>	<i>Codonopsis pilosula var. modesta</i>	97
	<a href="#">AF136237.1</a>	<i>Codonopsis nervosa</i>	94
	<a href="#">AY548195.1</a>	<i>Codonopsis lanceolata</i>	93
	<a href="#">DQ889459.1</a>	<i>Codonopsis javanica subsp. japonica</i>	89

Построение дендрограммы (рис. 3) по нуклеотидным последовательностям ITS регионов *rDNA* образцов, зарегистрированных в GenBank, позволяет видеть, что виды Кодонопсиса *C. kawakamii*, *C. tangshen*, *C. pilosula* и *C. pilosula var. modesta* имеют близкородственное положение и от вида *C. kawakamii* отходят отдельной и более отдаленной ветвью *C. lanceolata* и *C. javanica subsp. japonica*.

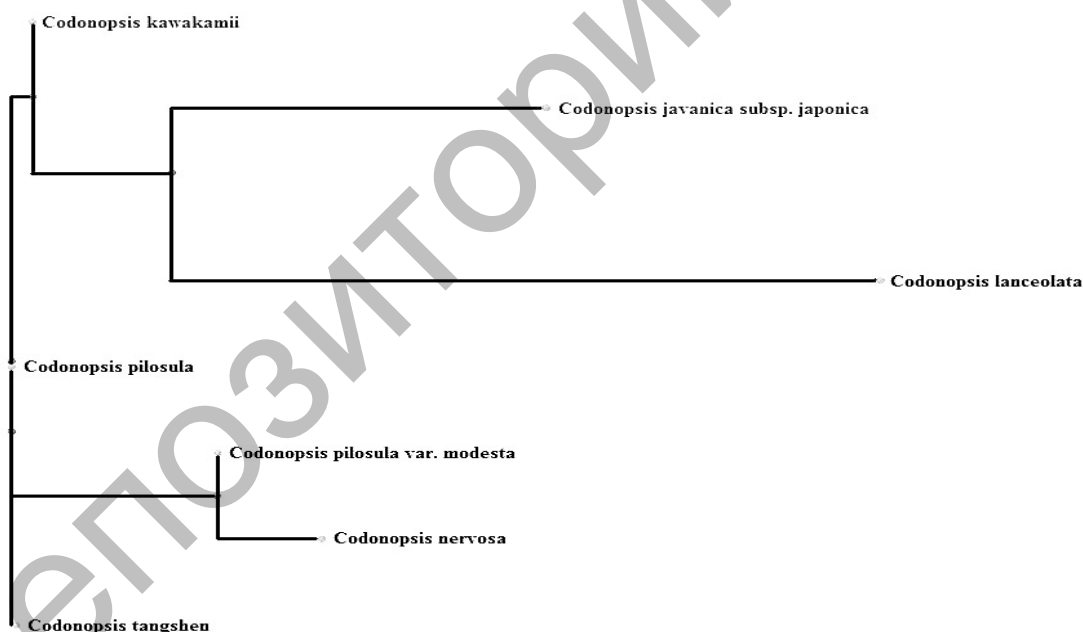


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по нуклеотидным последовательностям ITS регионов *rDNA* образцов, зарегистрированных в GenBank

Делая выводы, отметим, что отсутствие данных о нуклеотидной последовательности *C. clematidea* (Shrenk) Clark, вероятно, обусловлено отсутствием соответствующих зарегистрированных последовательностей в использованной нуклеотидной базе GenBank NCBI. Кроме того, по некоторым данным установлено, что отдельные виды *Codonopsis spp.* невозможно дифференцировать по ITS региону рибосомальной ДНК, так как данная последовательность является высоко консервативной [22].

Нуклеотидная база данных GenBank NCBI (США) является свободно-доступной и одной из больших баз данных, наряду с такими, как EMBL (Европа) и DDBJ (Япония). Однако эти базы не

включают информацию, хранящуюся и выдаваемую на платной основе в частных базах данных, которые зачастую создаются при различных университетах. Известно, что результаты, полученные на большей базе данных, обладают большей биологической значимостью. Поэтому представляется необходимым создание и пополнение собственной базы данных о нуклеотидных последовательностях ДНК лекарственных растений Казахстана и их генотипирование по различным локусам генома в целях лучшего понимания сходства организмов и их взаимного расположения на эволюционном древе. Перспектива видится в развитии молекулярно-генетических методов, основанных на сравнении их полных геномов, что на сегодня становится вполне возможным.

#### Список литературы

1. *Lammers T.G.* Circumscription and phylogeny of the Campanulales // *Ann. Missouri Bot. Gard.* — 1992. — Vol. 79. — P. 388–413.
2. *Takhtajan A.L.* Diversity and Classification of Flowering Plants. — New York: Columbia Univ. Press, 1997.
3. *Aripova S.F.* Alkaloid content of *C. clematidea* // *Chemistry of natural compounds.* — 1996. — Vol. 32. — № 4. — P. 564–566.
4. *Perveen A., Qaiser M.* Pollen Flora of Pakistan — XIII. *Campanulaceae* // *Tr. J. of Botany.* — 1999. — Vol. 23. — P. 45–51.
5. *Shulkina T.V., Gaskin J.F., and Eddie W. M.M.* Morphological studies toward an improved classification of *Campanulaceae* s.str. // *Ann. Missouri bot. Gard.* — 2003. — Vol. 90. — P. 576–591.
6. *Павлов Н.В.* Растительное сырье Казахстана — М.-Л., 1947. — С. 459.
7. Флора СССР. Т. 24. — М.-Л.: Академия наук, 1957.
8. Иллюстрированный определитель растений Казахстана. — Алма-Ата: Наука КазССР, 1972. — С. 304.
9. *Songlin Li, Quanbin Han, Chunfeng Qiao, Jingzheng Song, Chuen Lung Cheng and Hongxi Xu.* Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview // *Chinese Medicine.* — 2008. — Vol. 3. — № 7. — P. 1–16.
10. *Li C.Y., Xu H.X., Han Q.B., Wu T.S.* Quality assessment of Radix *Codonopsis* by quantitative nuclear magnetic resonance // *J.Chromatogr A.* — 2009. — Vol. 1216. — № 11. — P. 2124–2149.
11. *Ishida S., Okasaka M., Ramos F., Kashiwada Y., Takaishi Y., Kodzhimatov O.K., Ashurmetov O.* New alkaloids from the aerial parts of *Codonopsis clematidea* // *J.Nat.Med.* — 2008. — Vol. 62. — P. 236–238.
12. Chinese Pharmacopoeia Commission: *Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume 1.* — Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. — P. 197.
13. *Soo-Hyun Kim, Hyun-Jin Choi, Hyun-Taek Oh, Mi-Ja Chung1, Cheng-Bi Cui2, and Seung-Shi Ham.* Cytoprotective Effect by Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* Ethyl Acetate Fraction in Human HepG2 Cells // *Korean J.Food Sci. Technol.* — 2008. — Vol. 40. — № 6. — P. 696–701.
14. *Lee K.-W., Jung H.-J., Park H.-J., Kim D.-G., Lee J.-Y., and Lee K.-T.* b-D-Xylopyranosyl-(1→3)- b-D-glucuronopyranosyl Echinocystic Acid Isolated from the Roots of *Codonopsis lanceolata* Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Acute Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells // *Biol. Pharm. Bull.* — 2005. — Vol. 28. — № 5. — P. 854–859.
15. *Tsai T.-H. and Lin L.-Ch.* Phenolic glycosides and pyrrolidine alkaloids from *Codonopsis tangshen* // *Chem. Pharm. Bull.* — 2008. — Vol. 56. — № 11. — P. 1546–1550.
16. *Yang X., Zhao Y., Ruan Y., and Yang Y.* Development and Application of a Capillary Electrophoretic Method for the Composition Analysis of a Typical Heteropolysaccharide from *Codonopsis pilosula* Nannf. // *Biol. Pharm. Bull.* — 2008. — Vol. 31. — № 10. — P. 1860–1865.
17. *Pui Ying Yip, Chi Fai Chau, Chun Yin Mak and Hoi Shan Kwan.* DNA methods for identification of Chinese medicinal materials // *Chinese Medicine.* — 2007, 2:9. — P. 234–253.
18. *Eddie, W. M. M.* A Global reassessment of the Generic Relationships in the Bellflower Family (*Campanulaceae*). Ph.D.Thesis, University of Edinburgh. — 1997), гена *rbcL* (Cosner, M. E., Jansen R. K. and Lammers T.G. Phylogenetic relationships in the *Campanulales* based on *rbcL* sequences // *Pl. Syst. Evol.* — 1994. — Vol. 190. — P. 79–95.
19. *Eddie W. M.M., Shulkina T., Gaskin J., Haberle R.C., and Jansen R.K.* Phylogeny of *Campanulaceae* s. str. inferred from its sequences of nuclear ribosomal DNA // *Ann. Missouri Bot. Gard.* — 2003. — Vol. 90. — P. 554–575.
20. *Fu R.Z., Wang J., Zhang Y.B., Wang Z.T., But P.H., Li N., Shaw P.C.* Differentiation of medicinal *Codonopsis* species from adulterants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism // *Planta Medica.* — 1999. — Vol. 65. — № 7. — P. 648–650.
21. *Doyle J.J. and Doyle J.L.* A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* — 1987. — Vol. 19. — P. 11–15.
22. *Zhang Y.-B., Shaw P.-C., Sze C.-W., Wang Z.-T. and Tong Y.* Molecular Authentication of Chinese Herbal Materials // *Journal of Food and Drug Analysis.* — Vol. 15. — № 1. — 2007. — P. 1–9.