

О. В. Решетняк, Н. Д. Черняк, И. Н. Смоленская, А. В. Орешников,
Ю. Н. Смирнова, А. М. Носов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГИНЗЕНОЗИДОВ В РАЗНЫХ ЧАСТЯХ КОРНЕЙ И В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО

Институт физиологии растений РАН, Москва

ВЭЖХ-анализ экстракта разных частей шестилетних плантационных корней *Panax ginseng* (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея) показал присутствие в нем 7 анализируемых гинзенозидов (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re). Их суммарное содержание составляло: для основных корней — 1,16 и 0,64 %; для корневища — 4,00 и 4,60 %; для боковых корней ($d = 0,4 - 0,5$ см) — 6,79 и 4,38 %; для тонких корешков ($d = 0,1 - 0,15$ см) — 13,26 и 11,37 %. Из боковых и тонких корней было получено 4 новых линий каллусов женьшеня. ВЭЖХ-анализ качественного и количественного состава биомассы после первого года культивирования показал присутствие во всех линиях полного спектра гинзенозидов (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re), суммарное содержание которых колебалось от 0,2 до 0,4 %. ВЭЖХ-контроль этих каллусных линий в течение 5 лет культивирования обнаружил постепенное исчезновение из спектра гликозидов гинзенозидов Rb₂, Rc, Rd, Rf. В дальнейшем из рыхлых каллусов, растущих на среде с 0,5 и 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина, были получены суспензионные культуры — L-1 и L-2, соответственно. ВЭЖХ-анализ качественного и количественного состава гликозидов в суспензионной культуре показал присутствие в обоих линиях только гинзенозидов Rb₁, Rg₁ и Re, с преобладанием Re-гинзенозида.

Женьшень часто называют “корнем жизни”, приписывая ему способность продлевать жизнь и восстанавливать утраченное здоровье. В растениях и культуре клеток рода *Panax* в последнее время широко изучаются присутствие и лечебное действие таких соединений, как полисахариды [1], полиацетилены [2], эфирные масла [3], тритерпеновые гликозиды [4–12] и другие.

Женьшень синтезирует по крайней мере 30 различных тетрациклических (даммаранового типа) и пентациклических (олеананового типа) тритерпеновых гликозидов — гинзенозидов. Тетрациклические тритерпеновые гликозиды даммаранового типа — уникальные соединения, синтезируемые только растениями рода *Panax* [4]. По структуре агликонов их можно разделить на две группы: 20(S)-протопанаксадиола (Rb-группа) и 20(S)-протопанаксатриола (Rg-группа) [5]. Эти группы соединений часто обладают противоположной фармакологической активностью. Например, гликозиды Rb-группы подавляют ЦНС-активность, понижают артериальное давление, а гликозиды Rg-группы увеличивают ЦНС-активность и повышают артериальное давление [1, 3]. Именно гинзенозидам принадлежит “пальма первенства” в фармакологическом воздействии на человека.

В природе ареал произрастания сильно ограничен как для женьшеня настоящего *Panax ginseng* (Приморье, Китай, Корея), так и для других видов: *P. japonicus* (Япония, Китай), *P. quinquefolium* (США, Канада), *P. notoginseng* (Китай) [3]. Принимая во внимание резкое сокращение природных запасов женьшеня, в разных странах были предприняты попытки выращивания растений на плантациях [1, 3], а позднее и введе-

ние различных видов женьшеня в культуру клеток [6–10].

По данным литературы [5, 7, 11, 12] сравнительный анализ синтеза гинзенозидов в различных частях корня женьшеня (в основном корневище и боковых корнях разного диаметра) показывает, что содержание гинзенозидов в боковых корнях может быть в несколько раз выше, чем в основном корне и корневище этого же растения.

С начала исследований по культуре клеток растений рода *Panax* (Р. Г. Бутенко, 60-е годы XX столетия, Россия) в научной литературе накоплено много данных по содержанию гинзенозидов в клетках *in vitro*, которое варьирует от исчезающих количеств до уровней, наблюдаемых в интактных растениях. Сравнительный анализ синтеза гинзенозидов в различных частях корня женьшеня и культивируемых клеток, полученных из них, в литературе встречается крайне редко [7, 9]. Чаще всего для введения в культуру в качестве экспланта используют сегмент основного 6-ти летнего корня [6, 7, 9], хотя по своим биосинтетическим параметрам это наименее богатая гинзенозидами часть корня [5, 7, 11, 12].

Целью нашей работы было сравнение уровня синтеза гинзенозидов в различных частях корней *Panax ginseng* С. А. Meyer, получение каллусной и суспензионной культуры клеток из боковых корней разного диаметра и сравнение уровня синтеза в исходных корнях и в условиях *in vitro*.

Экспериментальная часть

Объектами исследования были разные части (сегмент основного корня, корневище и боковые корни разного диаметра) двух шестилетних плантационных

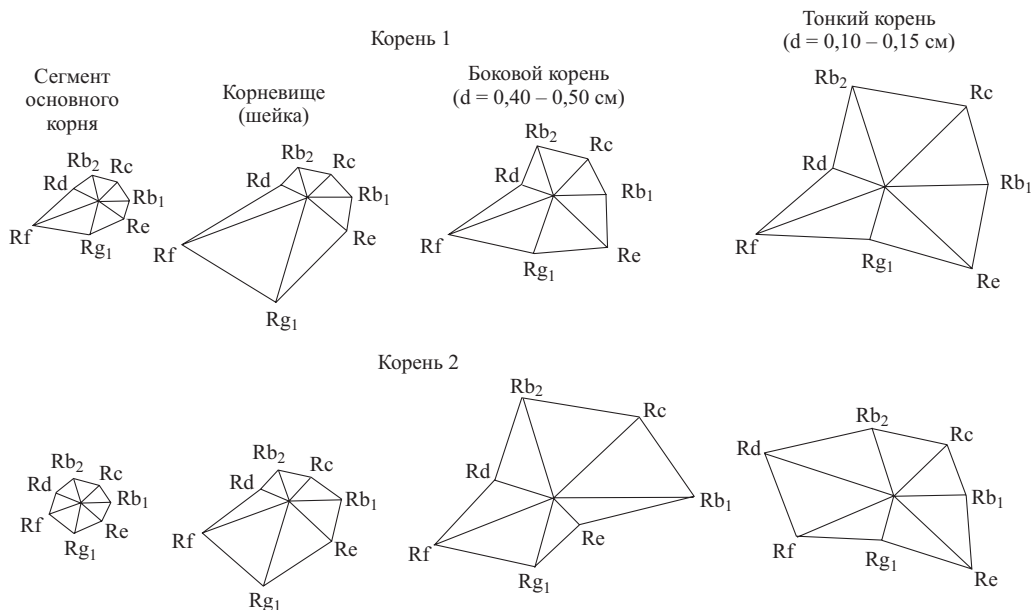


Рис. 1. Состав и соотношение гинзенозидов в разных частях шестилетних корней *Panax ginseng* (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея).

корней *Panax ginseng* (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея) и культура клеток, полученная в декабре 1995 года в Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН. Для введения в культуру клеток были использованы части боковых ($d = 0,4 - 0,5$ см) и тонких ($d = 0,1 - 0,15$ см) корней, как наиболее продуктивные по содержанию гинзенозидов по данным предварительного ВЭЖХ-анализа.

ВЭЖХ-анализ гинзенозидов проводили по представленной нами ранее методике [10]. Для анализа гинзенозидов в различных частях корня использовали 200 – 250 мг (точная навеска) измельченных сырых образцов. 2 – 3 г сырой биомассы (точная навеска) культуры клеток женьшеня отбирали для анализа параллельно с образцами каллусов и суспензии для измерения ростовых параметров. Разделение гинзенозидов про-

водили на стальной колонке с Lichrosorb RP-18 (4×250 мм) (5 мкм) на приборе фирмы “LKB” (Швеция) в двух изократных режимах при скорости потока 0,5 мл/мин:

1. Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd — ацетонитрил: вода в объемном соотношении 35:65.
2. Rg₁, Re — ацетонитрил – вода в объемном соотношении 22:78.

Детектирование проводили при длине волны 203 нм. Для количественного определения использовали метод абсолютной калибровки относительно индивидуальных гинзенозидов фирмы “Sigma” (США). Пересчет индивидуального и суммарного содержания гинзенозидов проводили на абсолютно сухой вес. Влажность образцов определяли по методике ГФ-ХІ, вып. 1, с. 336, 400 [13]. Минимально определяемое ко-

Таблица 1
Содержание гинзенозидов в разных частях корней женьшеня *Panax ginseng* С. А. Meyer (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея)

Образец части корня	Содержание гинзенозидов в мг/г сухой биомассы									Вл., %
	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	Rf	Rg ₁	Re	Rb-гр., Rg-гр.	Сум. (%)	
Корень 1*										
Сегмент основного корня	0,24	0,19	0,28	0,02	0,65	0,76	9,42	0,73, 10,83	11,56 (1,16)	64,5
Шейка корня	1,41	0,75	0,53	0,10	1,49	4,24	31,46	2,79, 37,19	39,98 (4,00)	64,7
Боковой корень $d = 0,40 - 0,50$ см	2,22	2,26	2,20	0,38	1,24	1,87	57,76	7,06, 60,87	67,93 (6,79)	78,7
Тонкие корни $d = 0,10 - 0,15$ см	6,33	7,98	6,05	1,93	1,50	1,61	107,23	22,29, 110,34	132,63 (13,26)	82,0
Корень 2**										
Сегмент основного корня	0,20	0,20	0,30	0,10	0,10	0,50	5,00	0,80, 5,60	6,40 (0,64)	66,4
Шейка корня	2,00	0,70	0,70	0,20	0,90	3,30	38,50	3,60, 42,70	46,30 (4,60)	74,8
Боковой корень $d = 0,40 - 0,50$ см	9,30	8,40	6,30	2,60	1,40	2,30	13,50	26,60, 17,20	43,80 (4,38)	87,5
Тонкие корни $d = 0,10 - 0,15$ см	3,80	4,60	3,60	7,70	1,10	1,10	91,90	19,70, 94,00	113,70 (11,37)	84,5

* Из корня 1 получены культуры клеток L-2 и L-4.

** Из корня 2 получены культуры клеток L-1 и L-3.

личество каждого индивидуального гинзенозида было равно 20 мкг/г абсолютно сухой биомассы.

Качественный состав подтверждали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя полученный для ВЭЖХ-анализа экстракты образцов. Разделение проводили на стеклянных пластинках с Kieselgel 60 (Merck, Германия) в хроматографической системе хлороформ – изопропанол – уксусная кислота – вода (20:20:5:5, по объему). Обнаружение гликозидов проводили 10 % раствором серной кислоты в этаноле с последующим прокаливанием при 100 – 110 °С.

Каллусные культуры выращивали на агаризованной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге и Скуга, содержащей витамины по Уайту, 3 % сахарозы, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) — 2 мг/л и 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 0,5 и 0,2 мг/л в темноте при 26 °С в чашках Петри диаметром 10 см с циклом культивирования 30 дней. Суспензионные культуры выращивали в темноте на аналогичных жидких средах в колбах на качалке при

скорости вращения 110 об/мин и радиусе вращения качалки 18 – 20 мм с циклом выращивания 20 суток.

Число клеток подсчитывали в камере Фукса-Розенталя после мацерации суспензии в 10 % растворе хромовой кислоты при 60 °С в течение 15 мин. Рост культур характеризовали также по весу сухой и сырой биомассы. Для определения жизнеспособности клетки окрашивали 0,1 % водным раствором эозина (окрашиваются мертвые клетки). Просчитывали число окрашенных клеток на 200 клеток, а затем определяли процент живых.

По первичным результатам, характеризующим рост культуры рассчитывали производные параметры роста:

$$\text{индекс роста: } I = X_{\max}/X_0;$$

$$\text{удельную скорость роста в экспоненте: } \mu = (\Delta \ln X/X_0)/\Delta t;$$

$$\text{время удвоения: } T = \ln 2/\mu,$$

где X_{\max} — максимальное значение параметра в цикле роста;

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания гинзенозидов в образцах биомассы культуры клеток, полученной из боковых корней *Panax ginseng* С. А. Meyer (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея) при длительном культивировании

Образец биомассы, сутки	Содержание гинзенозидов в мг/г сухой биомассы									
	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	Rf	Rg ₁	Re	Rb-гр., Rg-гр.	Сумма (%)	
*L-1 (<i>d</i> = 0,10 – 0,15 см, 0,5 мг/л БАП, рыхлый каллус)										
1997 г. 36-е сутки	0,40	0,20	0,16	0,03	0,88	0,15	1,40	1,67, 2,43	4,10 (0,41)	
1998 г. 33-е сутки	0,16	0,10	0,07	след	–	0,23	1,56	0,33, 1,79	2,12 (0,21)	
2001 г. 38-е сутки	след	–	–	–	–	0,05	0,17	следы, 0,22	0,22 (0,02)	
Суспензия 2002 г. 14-е сутки	0,07	–	–	–	–	0,01	0,17	0,07, 0,18	0,25 (0,03)	
*L-2 (<i>d</i> = 0,40 – 0,50 см, 0,2 мг/л БАП, рыхлый каллус)										
1997 г. 36-е сутки	0,67	0,65	0,69	0,03	0,33	0,21	0,90	2,04, 1,44	3,48 (0,35)	
1998 г. 33-е сутки	0,14	0,18	0,13	0,03	–	0,21	1,46	0,48, 1,67	2,15 (0,22)	
2001 г. 38-е сутки	0,05	–	–	–	–	0,08	0,33	0,05, 0,41	0,45 (0,05)	
Суспензия 2002 г. 14-е сутки	0,04	–	–	–	0,07	0,48	3,46	0,04, 4,01	4,05 (0,41)	
*L-3 (<i>d</i> = 0,40 – 0,50 см, 0,5 мг/л БАП, плотный каллус)										
1997 г. 36-е сутки	2,29	0,17	0,19	0,07	–	0,19	0,41	2,72, 0,60	3,32 (0,33)	
1998 г. 33-е сутки	0,25	0,12	0,10	след	–	0,15	1,60	0,49, 1,75	2,24 (0,22)	
2001 г. 38-е сутки	след	–	–	–	–	0,05	0,58	Следы, 0,63	0,63 (0,06)	
*L-4 (<i>d</i> = 0,10 – 0,15 см, 0,2 мг/л БАП, плотный каллус)										
1997 г. 36-е сутки	0,48	0,41	0,30	0,06	0,65	0,25	2,02	1,25, 2,92	4,17 (0,42)	
1998 г. 33-е сутки	0,59	0,17	0,17	след	–	0,23	2,91	0,93, 3,14	4,07 (0,41)	
2001 г. 38-е сутки	след	–	–	–	–	0,24	2,13	Следы, 2,37	2,37 (0,24)	

* L-1, L-2, L-3, L-4 — штаммы культуры клеток, полученные из разных по толщине боковых корней двух корней *Panax ginseng* С. А. Meyer (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея)

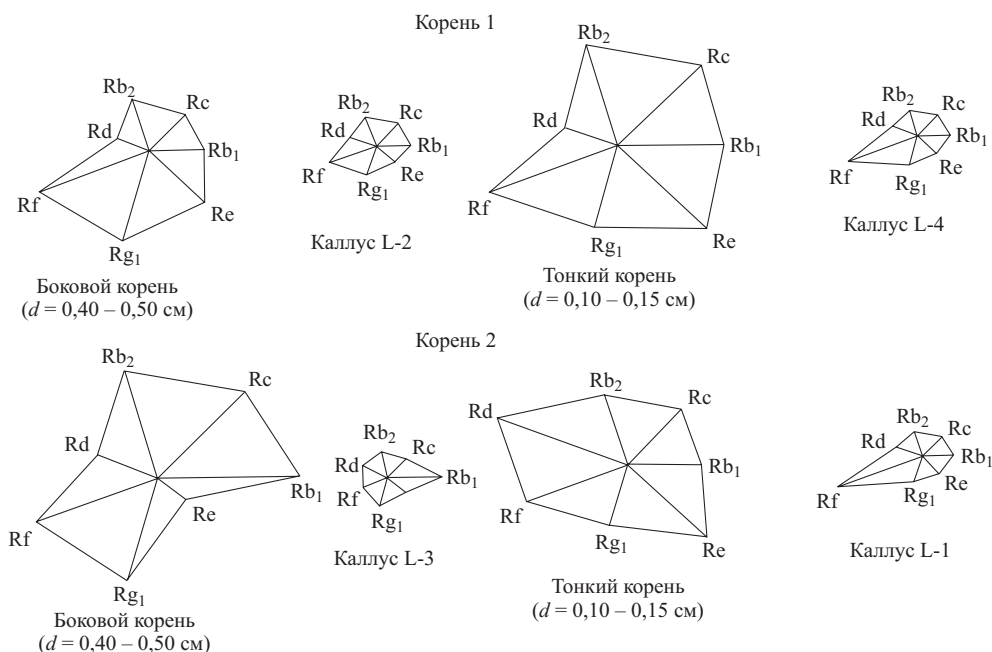


Рис. 2. Состав и соотношения гинзенозидов в корнях и каллусных культурах *Panax ginseng* (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея)

X_0 — начальное значение параметра в цикле роста,
 $\Delta \ln X / X_0$ — разница значений параметра в полулогарифмической системе координат в начале экспоненциальной фазы роста и в конце

Δt — значение времени длительности экспоненциальной фазы роста, сутки.

Результаты и их обсуждение

В декабре 1995 г. был проведен ВЭЖХ-анализ сырых образцов различных частей шестилетних плантационных корней женьшеня *Panax ginseng* (Ginseng &

Tobacco Company, Южная Корея). При расчете содержания гинзенозидов учитывали влажность образцов [13]. Для ВЭЖХ-анализа были использованы: сегмент средней части основного корня, корневище (шейка), а также боковые корни разного диаметра — $d = 0,40 - 0,50$ см и $d = 0,10 - 0,15$ см. Как видно из результатов проведенного анализа (см. табл. 1), в разных частях корня присутствуют все 7 анализируемых гинзенозида: Rb₁, Rb₂, Rc, Rd (Rb-группа) и Rf, Rg₁, Re (Rg-группа), но количественно они сильно отличаются. У сегмента основного корня и корневища суммарное содержание 7 гинзенозидов значительно ниже (1,16, 0,64 и 4,00, 4,63 %, соответственно), чем у боковых корней, а суммарное содержание тритерпеновых гликозидов увеличивается с уменьшением диаметра боковых корней ($d = 0,40 - 0,50$ см — 6,79 и 4,38 %; $d = 0,10 - 0,15$ см — 13,26 и 11,37 %, соответственно). Из данных литературы известно [5, 7, 9, 11, 12], что основная масса гинзенозидов в корнях интактного растения женьшеня локализуется в наружной части — между флоэмой и перидермой, состоящей из паренхимных клеток. Исходя из этого уменьшение содержания гинзенозидов связывают прежде всего с увеличением доли флоэмы и ксилемы в основном корне и корневище по сравнению с более тонкими корнями.

Несмотря на значительную разницу в количественном содержании, соотношение гинзенозидов между собой остается практически неизменным во всех частях корня, особенно это относится к корню 1 (см. рис. 1). Для облегчения визуальной оценки соотношения гинзенозидов между собой была использована компьютерная программа математического пакета “STATGRAPHICS” “Star Symbol”. Полученные диаграммы имеют вид “звезд”, лучи которых соответствуют отдельным гинзенозидам. Используемое програм-

Таблица 3
Характеристики роста суспензионных культур клеток *Panax ginseng* С. А. Мейер — L-1 и L-2

Показатель	L-1	L-2
Индекс роста (I)		
сухого веса	3,8 ± 0,45	3,3 ± 0,64
сырого веса	3,3 ± 1,3	5,4 ± 1,17
числа клеток	5,5 ± 0,34	1,8 ± 1,8
Удельная скорость роста μ , сут ⁻¹		
сухого веса	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,05
сырого веса	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,09
числа клеток	0,11 ± 0,04	0,05 ± 0,005
Время удвоения ($T_{уд}$), сут		
сухого веса	5,35 ± 0,15	6,85 ± 0,35
сырого веса	6,74 ± 0,80	5,70 ± 0,40
числа клеток	6,28 ± 0,73	13,80 ± 0,10
Жизнеспособность, %	88,8 ± 2,65	90,6 ± 1,5
Агрегированность, %		
мелкая фракция	66,2 ± 2,00	56,8 ± 3,50
средняя фракция	22,5 ± 1,67	23,9 ± 1,90
крупная фракция	11,3 ± 0,40	19,3 ± 0,25

мой масштабирование абсолютных величин позволяет сравнивать как очень большое, так и очень маленькое содержание гинзенозидов в образце, что дает возможность наглядно оценить вариативность состава гинзенозидов в исследуемых образцах.

Для введения в культуру были выбраны боковые корни разного диаметра: $d = 0,40 - 0,50$ см и $d = 0,10 - 0,15$ см, как обладающие, после проведения предварительного ВЭЖХ-анализа, более высоким уровнем биосинтеза и имеющие весь спектр корневых тканей. Из них было получено 8 новых линий каллусов женьшеня.

Первичный каллус получали на агаризованной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге и Скуга, содержащей витамины по Стаба, 3 % сахарозу и комплекс гормонов: α -нафтилуксусная кислота (α -НУК) — 2 мг/л; 2,4-Д — 0,05 мг/л; кинетин — 0,15 мг/л и БАП — 0,15 мг/л. В дальнейшем при оптимизации сред по ростовым параметрам каллусные штаммы были переведены на агаризованную питательную среду с минеральной основой по Мурасиге и Скуга, содержащей витамины по Уайту, 3 % сахарозы, 2,4-Д — 2 мг/л и БАП. Концентрация БАП для 5 штаммов была 0,5 мг/л, а для 3-х штаммов — 0,2 мг/л. При введении и выращивании в суспензионной культуре клеток состав среды для разных штаммов соответствовал составу среды этих же каллусных штаммов.

В коллекции были оставлены 4 каллусных штамма, отличающиеся: эксплантами — разные по толщине ($d = 0,40 - 0,50$ см и $d = 0,10 - 0,15$ см) боковые корни двух плантационных корней женьшеня; морфологией (плотные и рыхлые); индексом роста (3 – 4 и 6 – 8); содержанием БАП в среде: 0,2 мг/л — для каллусов, полученных из первого корня (L-2, L-4), и 0,5 мг/л — для каллусов, полученных из второго корня (L-1, L-3).

Как видно из представленных результатов (см. табл. 2), ВЭЖХ-анализ качественного и количественного состава биомассы после первого года культивирования показал присутствие во всех линиях полного спектра гинзенозидов (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re), суммарное содержание которых колебалось от 0,3 до 0,4 %. ВЭЖХ-контроль этих каллусных линий в течение 5 лет культивирования обнаружил постепенное исчезновение из спектра гликозидов гинзенозидов Rb₂, Rc, Rd, Rf, а также снижение уровня синтеза гинзенозидов Rb₁, Rg₁, Re.

В 1998 г. из рыхлых каллусов были получены суспензионные культуры L-1 и L-2, отличающиеся диаметром введенных боковых корней и концентрацией БАП в питательной среде. L-1 — из корня с $d = 0,10 - 0,15$ см растет на среде с 0,5 мг/л БАП, а L-2 — из корня с $d = 0,40 - 0,50$ см растет на среде 0,2 мг/л БАП. По своим ростовым характеристикам (см. табл. 3) суспензионные культуры клеток L-1 и L-2 близки по таким параметрам как: жизнеспособность (88,8 и 90,6 %), агрегированность и удельная скорость роста биомассы. Индекс роста по числу клеток у L-1 выше (5,5), чем у L-2 (1,8), а время удвоения по числу

клеток больше у L-2 (13,80), чем у L-1 (6,28). На основании этого можно сделать вывод, что по числу клеток суспензионная культура клеток L-1 приростает значительно больше, чем L-2. Однако биосинтетические способности L-2 выше, чем L-1 (суммарное содержание гинзенозидов 0,41 и 0,03 %, соответственно) в 10 раз (см. табл. 3). ВЭЖХ-анализ качественного и количественного состава гликозидов в суспензионной культуре показал присутствие в обеих линиях только гинзенозидов Rb₁, Rf, Rg₁ и Re, с преобладанием Re-гинзенозида.

Визуальная оценка соотношения гинзенозидов в образцах боковых корней и ранних каллусных культур (см. рис. 2) позволяет утверждать о близости биосинтетических характеристик этих объектов, несмотря на значительную разницу в суммарном содержании гликозидов. Прежде всего это относится к каллусам L-2 и L-4, введенным из боковых корней корня 1.

Сходство вторичного метаболизма экспланта и полученной из него культуры клеток отмечалась ранее другими авторами [7, 9]. В ряде случаев не наблюдается корреляции между продуктивностью исходного растения и органа с полученной культурой клеток [14]. В других случаях эпигенетические характеристики исходного экспланта оказываются достаточно стойкими в клетках *in vitro* [15]. В нашем случае в культуре клеток со временем культивирования изменяется качественный состав гинзенозидов и снижается их содержание. В то же время известно, что оптимизация условий и режимов выращивания культур клеток позволяет существенно влиять на их биосинтетические характеристики. Этой проблеме будут посвящены дальнейшие работы с этими объектами.

Данная работа была поддержана РФФИ грант № 04-04-48139 и грант № 05-04-48564.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. C. Lee, "Facts about Ginseng. The elixir of life", Seoul, Korea (1992).
2. D. Washida, S. Kitanaka, *Enzyme and microbial technology*, **32**(3 – 4), 498 – 503 (2003).
3. И. В. Грушвицкий, Б. К. Пушкин, Д. А. Муравьева, *Наука волшебник женьшень. Легенды и действительность*, Омск (1989).
4. O. Tanaka, *Pure and applied chemistry*, **62**(7), 1281 – 1284 (1990).
5. Н. И. Уварова, В. В. Маханьков, Г. В. Малиновская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(3), 19 – 25 (2000).
6. Р. Г. Бутенко, *Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений*, Наука, Москва (1964).
7. Н. А. Константинова, В. В. Маханьков, Н. И. Уварова и др., *Химия природ. соедин.*, № 6, 808 – 813 (1991).
8. A. Mathur, A. K. Mathur, M. Pal, G. C. Uniyal, *Planta Med.*, **65**(5), 484 – 486 (1999).
9. К. Т. Чой, И. О. Ахн, Д. С. Пак, *Физиол. раст.*, **41**(6), 784 – 788 (1994).
10. О. В. Решетняк, И. Е. Князьков, И. Н. Смоленская и др., *Биотехнол.*, № 2, 69 – 75 (2003).
11. M. Kubo, T. Tani, T. Katsuki, et al., *J. Natural products*, **43**(2), 278 – 274 (1980).
12. K. Samukawa, H. Yamashita, H. Matsuda, M. Kubo, *Yakugaku Zasshi*, **115**(3), 241 – 249 (1995).

13. Государственная Фармакопея XI изд. (1), Медицина, Москва (1987), сс. 285 – 286.
14. M. Suzuki, K. Nakagava, H. Fukui, M. Tabata, *Plant Cell Rep.*, **6**, 260 – 263 (1987).
15. E. J. Staba, *Proc. Y Intern. Congr. Plant tissue & cell culture*, Tokyo (1982), pp. 25 – 30.

Поступила 23.01.06

COMPARATIVE ANALYSIS OF GINSENOSES IN VARIOUS PARTS OF ROOTS AND IN CULTIVATED TISSUE CULTURES OF *Panax Ginseng*

O. V. Reshetnyak, N. D. Chernyak, I. N. Smolenskaya*, A. V. Oreshnikov, Yu. N. Smirnova, and A. M. Nosov

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

*e-mail: ismolenskaya@ippras.ru

HPLC analysis of the extracts from different parts of six year old plantation *Panax ginseng* roots (Ginseng & Tobacco Company, South Korea) revealed the presence of seven ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re). Their total content was: 1.16 and 0.64% in the main roots; 4.00 and 4.60% in the rhizomes; 6.79 and 4.38% in the lateral roots ($d = 0.4 - 0.5$ cm); and 13.26 and 11.37% in the thin roots ($d = 0.10 - 0.15$ cm). Four new *Panax* callus lines were initiated from lateral roots ($d = 0.4 - 0.5$ cm) and in thin roots ($d = 0.10 - 0.15$ cm). Qualitative and quantitative HPLC analysis of the biomass obtained after the first year of cultivation revealed the presence of the total spectrum of ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re) in all lines. Their total content varied between 0.2 and 0.4 %. HPLC monitoring of these callus strains during five-year cultivation showed evidence of the gradual elimination of ginsenosides Rb₂, Rc, Rd, and Rf. Later on, suspension L-1 and L-2 were initiated from loose calli growing in the medium supplemented with 0.5 or 0.2 mg/l BAP, accordingly. Qualitative and quantitative HPLC analysis of glycoside composition in suspension only revealed the presence of Rb₁, Rg₁ and Re ginsenosides with the simultaneous Re-ginsenoside predomination in both lines.