

УДК 581.143.6:576.5+663.1

ОТРИМАННЯ КАЛЮСНОЇ КУЛЬТУРИ *ECHIUM PLANTAGINEUM* L. – ПРОДУЦЕНТА ШИКОНІНУ

О. О. ПОРОННИК¹, М. Д. КУЧМА², В. А. КУНАХ¹

¹ – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² – Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут”

Україна, 03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37
e-mail: k.maria@ua.fm

Одержано культуру тканин синяка подорожникового *E. plantagineum* L. з корінців проростків насіння на агаризованому живильному середовищі 5C01. Вирощування на живильному середовищі LS-м ініціювало біосинтез червоних шиконінових пігментів. Відселектовано найпродуктивніший за шиконіном варіант (ЗЕр) культури тканин, приріст біомаси в якого складає 16,8 г/л за пасаж, а вихід шиконіну – 8,6 % в сухій масі. Загальна продуктивність варіанта ЗЕр на 14-ту добу росту становить 1,4 г на 1 л живильного середовища і 2,5 г/л шиконіну при подовженому пасажі на 20-ту добу росту.

Ключові слова: *Echium plantagineum* L., культура тканин рослин, червоні пігменти, шиконін, клітинні лінії – продуценти біологічно активних речовин

Вступ. Синяк подорожниковий – *Echium plantagineum* L. (syn. *E. lycopsis* L.) – трав'яниста рослина-дворічник, що належить до родини *Boraginaceae* [1]. Підземна частина рослини містить від 0,17 до 0,35% нафтохінонового червоного пігменту шиконіну [2]. Шиконін та його похідні здавна використовували на Сході як найцінніший червоний барвник (технічний, харчовий, косметичний), що виявляє й лікарські властивості [3, 4]. Рослинні пігменти фенольного походження, до яких належить шиконін, нетоксичні та перспективні для використання їх як дефіцитних природних харчових червоних барвників.

Рослини родини *Boraginaceae* не можуть бути сировинною базою для промислового отримання нафтохінонів. Шиконін японського біотехнологічного виробництва, є досить дорогим (близько 4500 \$ США за 1 кг).

Нами отримано культуру тканин *E. plantagineum*, яка може слугувати джерелом сировини для отримання червоних шиконінових пігментів. Перспективою є розробка промислової біотехнології отримання шиконінових похідних.

Матеріали і методи

Насіння. Для проведення досліджень використано насіння *E. plantagineum* урожаю 2003 року, отриманого з колекції Національного ботанічного саду імені М. М. Гришка НАН України (м. Київ).

Стерилізація. Насіння стерилізували з використанням 25 % розчину хлорвмісної рідини білизна “Купава” (з додаванням ПАР TWEEN) та 96 % етилового спирту.

Культивування. Пророщували насіння та ініціювали калюсоутворення на агаризованому живильному середовищі 5C01 з мінеральною основою, розробленою Волосовичем А. Г. із співавторами (1979), склад середовища див. [5].

Біосинтез шиконінових пігментів ініціювали на модифікованому середовищі Лінсмайера-Скуга (LS-м)[6]. Отриману культуру тканин *E. plantagineum* вирощували при температурі 25–27 °С без освітлення за відносної вологості повітря 70–80 %.

Первинний добір культури на підвищення продуктивності за шиконіном. Невеликі частинки калюсу занурювали у рідкий парафін “Парекс”. Через декілька хвилин відбувалась екстракція червоних пігментів. Перевагу надавали варіантам калюсу, що давали найяскравіше забарвлення парафінового екстракту. Методику добору детально описано в [7].

Приріст біомаси. Для побудови кривої росту визначали кількість сухої біомаси у відібраних пробах тканини таким методом: проби тканини висушували в сушильній шафі при температурі 45–50 °С до досягнення сталої ваги, суху тканину зважували на лабораторних вагах.

Визначення вмісту шиконіну. Висушену і подрібнену біомасу вичерпно

екстрагували етанолом 96%, додаючи свіжі порції спирту. Об'єднані спиртові екстракти аналізували фотоколориметричним методом. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі $\lambda=526$ нм ($\log e_{526}=3,87$). Вміст шиконіну в пробах тканин визначали за калібрувальною кривою, що побудовано за наважками очищених нафтохінонів [6].

Аналіз росту та вмісту шиконіну здійснювали кожні три доби протягом подовженого пасажу 20 діб, тоді як звичайний пасаж тривав 14 діб.

Статистична обробка. Використовували загальноприйнятий метод варіаційної статистики [8]. Обрахування критерію Стюдента проводили на ПК за допомогою програми Origin.

Результати і обговорення

Одержання первинного калюсу і пасивованих культур, та їхня характеристика. Первинні калюси були отримані у 2005 р. з корінців проростків насіння синяка подорожничкового на середовищі 5C01, яке розроблено для рослинних культур тканин-суперпродуцентів [5, 9].

Перші проростки синяка з'явилися через місяць після перенесення насінин врожаю 2003 р. на живильне середовище 5C01. З 35 насінин утворилось 6 проростків, з корінців яких на тому ж середовищі без будь-яких додаткових обробок утворювався калюс. Від різних проростків отримано по одному варіанту калюсу. Варіанти 1Ер, 2Ер, 3Ер, 4Ер та 6Ер було одержано з проростків довжиною 2-3 см через 1-2 дні після проростання. Варіант 5Ер з'явився через два місяці, з попереднім утворенням карликової рослини. Всі шість варіантів первинного калюсу на початку склались із світло-коричневих клітинних агрегатів розміром 2-3 мм. Через три пасажі варіант 1Ер загинув.

Таблиця. 1. Вміст шиконінових ефірів в калюсній тканині *Echium plantagineum*, % від сухої маси

№ пасажу	Варіант калюсу				
	2Ер	3Ер	4Ер	5Ер	6Ер
5	ЗК	0,38±0,019	ЗК	Сліди	ЗК
13	0,36±0,018	0,94±0,047	0,39±0,019	0,95±0,047	ЗК
17	0,30±0,015	1,25±0,062	0,27±0,013	1,00±0,050	ЗК
19	0,29±0,014	1,24±0,062	0,85±0,042	0,52±0,026	ЗК
20	0,64±0,032	1,18±0,059	0,46±0,023	0,59±0,029	0,33±0,016
22	0,40±0,020	1,22±0,061	0,51±0,025	—	0,20±0,010

Примітки: ЗК – залишкова кількість; варіант 5Ер через 20 пасажів загинув.

Через 4 місяці культивування калюс було перенесено на живильне середовище LS-м, розроблене для рослинних культур тканин, що продукують шиконін [6]. Культура тканин активно росла, спостерігали появу окремих червоно забарвлених мікроділянок калюсу. Калюс був відносно щільним, складався з клітинних агрегатів (глобул) розміром 1–3 мм.

Протягом другого пасажу на середовищі LS-м спостерігали ризогенез – масове утворення дрібних ниткоподібних корінців. Калюс набував бурого забарвлення. У цей період було проведено первинний добір культури на підвищений вміст шиконіну за допомогою рідкого парафіну згідно методики [7].

Отримані з різних насінин калюсні тканини сянєка мали ростові та фенотипові відмінності. Порівняльні дані з продуктивності за похідними шиконіну наведено в табл. 1.

Як найперспективніший за вмістом шиконіну та інтенсивністю росту, визначено варіант калюсу 3Ер, який також регенерував найменше корінців.

Продуктивність варіанта 3Ер тканини *Echium plantagineum*.

Калюсний варіант 3Ер формує маса клітинних агрегатів яскраво-червоно-

го забарвлення. Агрегати пухкі, легко відокремлюються один від одного. Розмір агрегатів коливається від 2 до 5 мм. Варіант 3Ер характеризується інтенсивним ростом.

Звичайна тривалість пасажу становить 14 днів. Ріст культури описується кривою (рис. 1), що побудована на основі даних накопичення сухої біомаси. Приріст біомаси на 14-ту добу росту складав у середньому 16,8 г сухої тканини на 1 л живильного середовища.

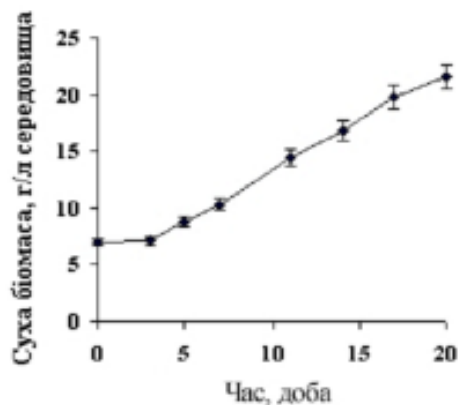


Рис. 1. Накопичення сухої біомаси варіанта 3Ер калюсної культури *Echium plantagineum* L. за умов подовженого до 20 діб пасажу (50-й пасаж)

На кінець звичайного пасажу (14 доба) калюсна тканина накопичувала 8,6 % шиконіну в перерахунку на суху

масу. Максимум накопичення шиконіну спостерігали при подовженому пасажі на 20-ту добу росту – 11,6 % (рис. 2). Загальна продуктивність варіанта ЗЕр на 14 добу росту становила 1,4 г на 1 л живильного середовища і 2,5 г/л шиконіну при подовженому пасажі на 20-ту добу росту.

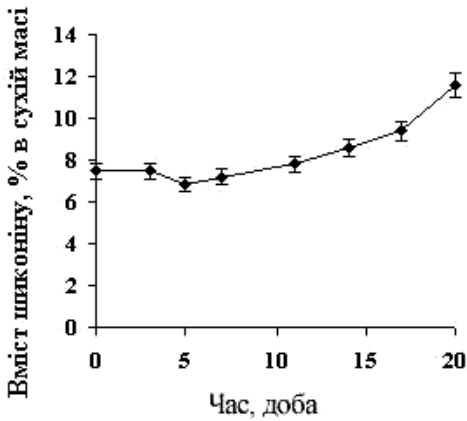


Рис. 2. Вміст шиконіну в сухій тканині варіанта ЗЕр культури тканин *Echium plantagineum* за умов подовженого до 20 діб пасажу (50-й пасаж)

Висновки

Введено в культуру *in vitro* сніяк подорожниковий *E. plantagineum*. Первинний калюс отримували з корінців насінневих проростків на середовищі 5C01, створеного для рослинних культур тканин–суперпродуцентів. Отримані калюсні тканини адаптовано до середовища LS-м, розробленого для синтезу шиконінових похідних.

Методом добору дрібних клітинних агрегатів проведено початкову селекцію на підвищену продуктивність за похідними шиконіну. Відібрано найперспективніший за показниками продуктивності варіант культури тканин *E. plantagineum* – ЗЕр.

Відселектована клітинна лінія сніяка ЗЕр накопичує 8,6 % шиконіну у сухій масі, маючи приріст біомаси 16,8 г/л за

тривалості пасажу 14 діб. Цей варіант культури тканин можна рекомендувати для розробки біотехнології отримання шиконіну.

Перелік літератури:

1. Доброчаева Д. Н. Бурачничкоцветные (*Borraginales* Hutch.) Европейской части СССР: Дис. ... докт. біол. наук: 03.00.12 – К., 1977. – С. 269–290.
2. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Caprifoliaceae* – *Plantaginaceae* / Под ред. Соколова П. Д. – Л.: Наука, 1990. – С. 109–133.
3. Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Couladouros E. A., Hepworth D., Nicolaou K. C. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1999. – Vol. 38. – P. 270–300.
4. Pietrosiuk A., Syklovska-Baranek K., Wiedenfeld H., Wolinowska R., Furmanowa M., Jaroszyk E. The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1052–1058.
5. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Потапчук Е. А., Музыка В. И., Колонина И. В. Получение культуры тканей *Ungernia Victoris* и её особенности при выращивании на питательных средах различного состава // *Биотехнология.* – 2007. – № 1. – С. 14–21.
6. Давыденков В. Н., Патудин А. В., Попов Ю. Г., Рабинович С. А., Мирошников А. И. Культура клеток *Arnebia euchroma* (Royle) *Jonst.* новый источник получения шиконина // *Хим.-фарм. журнал.* – 1991. – № 1. – С. 53–55.
7. Zakhlenjuk O. V., Kunakh V. A. *Arnebia euchroma*: *In vitro* culture and the production of shikonin and other secondary metabolites // *Biotechnology in agriculture and forestry.* – Vol. 41. – Berlin; Heidelberg: Springer-Verl., 1998. – P. 28–44.

8. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. М.: Финансы и статистика, 1982. – 344 с.
9. Кунах В. А., Алпатов Л. К., Можиленська Л. П. Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин // Патент на винахід, Україна, №10338А, пріоритет від 19.03.1993, опубліковано 25.12.1996, Бюл. №4.

Представлено О.В. Дубровною
Надійшла 7.11.2008

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ
ECHIMUM PLANTAGINEUM L. –
ПРОДУЦЕНТА ШИКОНИНА

О. А. Поронник¹, М. Д. Кучма², В. А. Кунах¹

¹ – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150

e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² – Национальный технический университет Украины “Киевский политехнический институт”

Украина, 03056, г. Киев, пр-т Победы, 37
e-mail: k.maria@ua.fm

Получена культура тканей *E. plantagineum* из корешков проростков семян на агаризованной питательной среде 5C01. Культивирование на питательной среде LS-m инициировало биосинтез красных шикониновых пигментов. Отсекалирован наиболее продуктивный по шиконину вариант каллусной культуры (3Ep). Прирост биомассы в культуре составляет 16,8г/л за пассаж, а выход шиконина – 8,6% в сухой массе. Общая продуктивность каллуса 3Ep на 14 день роста составляет 1,4 г шикони-

на на 1 л питательной среды и 2,5 г/л шиконина при продленном пассаже на 20 сут-ки роста.

Ключевые слова: *Echium plantagineum* L., культура тканей растений, красные пигменты, шиконин, клеточные линии – продуценты биологически активных веществ.

GENERATION OF *ECHIMUM PLANTAGINEUM* L. CALLUS CULTURE – PRODUCENT OF SHIKONIN

О. О. Поронник¹, М. Д. Кучма²,
В. А. Кунах¹

¹ – Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine

Ukraine, 03143, Kyiv,

Acad. Zabolotnogo str., 150

e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² – National Technical University of Ukraine

“Kyiv Polytechnic Institute”

Ukraine, 03056, Kyiv, Peremogy ave., 37

e-mail: k.maria@ua.fm

E. plantagineum tissue culture has been generated from the roots of seed shoots on 5C01 agarized nutrient medium. Cultivation on the LS-m nutrient medium induced biosynthesis of the red shikonin pigments. Variant of callus tissue (3Ep), accumulating 8.6% of shikonin derivatives per dry biomass whose yield on the 14th day of growth constituted up to 16.8 mg/L of nutrient medium was selected. The total 3Ep callus productivity of shikonin derivatives to 14th day of growth constituted up to 1.4 g/L and 2.5 g/L of nutrient medium under extended to 20th day of passage.

Key words: *Echium plantagineum* L., plant tissue culture, red pigments, shikonin, cell lines, producers of biologically active substances.