

Биология

УДК 615.322: 547.836.3.012

Е. Н. ЩЕРБАКОВА, Т. Б. КАРЯГИНА, Ю. Г. ПОПОВ

СИНТЕЗ НАФТОХИНОНОВ В ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЕ
ALKANNA ORIENTALIS

Получены каллусные культуры алканны (*Alkanna orientalis*) листового, корневого и стеблевого происхождения, способные к синтезу нафтохинонов. Повышение концентрации цитокинина в питательной среде способствует увеличению количества синтезируемых пигментов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в каллусной ткани корневого происхождения идентифицирован шиконин.

Введение. Широкое использование продуктов растительного происхождения в медицинской практике, пищевой и парфюмерной промышленности предполагает поиск новых источников биологически активных соединений. Метод культуры клеток и тканей растений представляет значительный интерес для создания новых клеточных технологий синтеза видоспецифичных хозяйственно важных продуктов [1–3].

Представители многих родов семейства бурачниковых (*Boraginaceae*) являются широко используемыми лекарственными растениями, продуцирующими целый ряд ценных вторичных метаболитов, к числу которых относятся и нафтохиноны. Наиболее изучены из этого класса веществ шиконин – 5,8-дигидрокси-2-(1-гидрокси-4-метил-пент-3-енил)-1,4-нафтохинон, и его эфиры. Нафтохиноновый пигмент шиконин широко используется в медицине, а также в парфюмерной и пищевой промышленности как краситель [4].

Однако литературные данные об изолированных культурах растений семейства *Boraginaceae* немногочисленны. Есть сообщения о введении в изолированную культуру только представителей родов *Lithospermum* [5–7], *Arnebia* [8, 9], *Anchusa* [10], *Ehium* [11], способных к накоплению ацильных производных шиконина. Что касается рода *Alkanna*, то имеются данные о синтезе пигментов в изолированной культуре только *Alkanna tinctoria* [12, 13]. Поэтому получение изолированной культуры *Alkanna orientalis*, разработка условий ее культивирования, обуславливающих как стабильный рост тканей, так и индукцию биосинтеза в них продуктов вторичного метаболизма, представляло определенный интерес.

Методы исследования. Объектом исследований являлись каллусные ткани алканны восточной (*Alkanna orientalis*), полученные из различных частей стерильно выращенных растений. В экспериментах использовались различные питательные среды: Мурасиге и Скуга (МС) [14]; модифицированная среда МС, содержащая 3мг/л бензиламинопурина (БАП), 0,5мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и условно обозначенная № 5; модифицированная среда МС, содержащая 2мг/л тиамин, 1мг/л никотиновой кислоты, 1мг/л БАП, 1мг/л кинетин, 0,5мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 0,2мг/л гибберелловой кислоты (ГК) и условно обозначенная № 7; модифицированная среда МС, содержащая тиамин, пиридоксин и никотиновую кислоту по 0,5мг/л, 2мг/л БАП, 0,5мг/л ИУК и обозначенная нами как среда Р. Для характеристики ростовой активности каллусных культур определяли вес сырой массы в граммах, вес сухой ткани в процентах (полученный высушиванием до постоянного веса при 60–80°C) и ростовой индекс (РИ) – отношение веса полученной сырой биомассы к первоначальному весу.

Для определения нафтохинонов навеску сухой каллусной ткани заливали 80%-ым этанолом и оставляли на 20 часов при 8°C. Затем нафтохиноны переводили в хлороформ, а из него – в 0,1N КОН. Пробы анализировали на спектрофотометре Ultrospec 1000 при 614нм против 0,1N КОН. В качестве стандарта использовали раствор шиконина в 0,1N КОН [15]. Исследование качественного состава этанольных экстрактов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе System Cold (Beckman). Колонка Luna Su C18 (250мм × 4,6мм). Система растворителей – ацетонитрил в 0,1%-ом ТФУ. Градиент – 45–75% ацетонитрила. Скорость потока – 1мл/мин. Анализ проводили при 254нм [16]. В качестве стандарта использовали раствор шиконина в спирте.

Результаты и обсуждение. Первые признаки каллусообразования у всех эксплантов наблюдались на средах МС и № 7 на 27–35 сутки культивирования, на среде Р образование каллуса началось позже – на 45–50 сутки.

На среде № 7 каллусные ткани были молочно-белого цвета, мягкие, рыхлые. Скорость нарастания каллусной массы была высокая – к концу пассажа, длящегося 28–30 дней, РИ составлял 24–26.

На среде МС образовавшаяся каллусная масса была серо-бурого цвета, твердая, рыхлая, легко распадающаяся на отдельные кусочки. Каллусы на этой среде обладали высоким органогенным потенциалом – из каллусной массы шло образование множественных корешков.

На среде Р экспланты корня и стебля сначала набухли, приобрели вишнево-коричневый цвет, после чего началось нарастание каллусной массы также вишнево-коричневого цвета по всей поверхности экспланта. У листовых эксплантов нарастание каллусной массы вишневого цвета наблюдалось вдоль раневой поверхности. Скорость нарастания каллусов на среде Р ниже, чем на среде № 7.

При дальнейшем пассировании каллусных тканей на среде Р отмечались различия в окраске, консистенции и нарастании биомассы в зависимости от происхождения. Каллусные ткани листового и корневого происхожде-

ния были буро-коричневого цвета, твердые, рыхлые, при встряхивании легко распадались на отдельные кусочки. К 15–20 дню культивирования на поверхности каллуса корневого происхождения появлялись клетки карминного цвета, и к концу пассажа, который длился 35–40 дней, вся ткань приобретала вишневый цвет. Иногда пигменты диффундировали в агар, из-за чего питательная среда окрашивалась в бурый цвет. РИ к концу пассажа составлял 15–17. Причем, если нарастание корневой каллусной массы происходило по всей поверхности агара, то рост каллусной массы листового происхождения шел в высоту.

Каллусная ткань стеблевого происхождения была рыхлая, но мягкая, росла медленнее, и к концу пассажа РИ составлял всего 10–12. Причем нарастающий каллус имел вначале молочно-сероватый цвет, а к концу пассажа ткань бурела.

Появление пигментации в каллусных тканях на средах различного состава (№ 7 и Р) может свидетельствовать о различных биосинтетических процессах, протекающих в них, и, в частности, об образовании нафтохиноновых пигментов. Так, при пересеве каллусной ткани молочного цвета со среды № 7 на среду Р уже на 4–5 сутки культивирования ткань приобретала розоватый цвет, а к концу пассажа вся ткань становилась вишневой. Поскольку питательные среды № 7 и Р отличаются составом гормональных факторов, а именно, увеличенным в два раза количеством БАП в составе среды Р и заменой НУК на ИУК, следовательно, можно предположить, что синтез нафтохиноновых пигментов в каллусных тканях находится под гормональным контролем [5, 11].

Поскольку интенсивность окраски каллусных тканей листового и особенно стеблевого происхождения была ниже, чем таковая корневого происхождения, то эти ткани были пересажены на среду № 5 с повышенным до 3 мг/л количеством БАП. Оказалось, что повышенное содержание БАП в среде, не влияя на скорость нарастания биомассы листового происхождения, интенсифицирует рост каллусной ткани стеблевого происхождения и усиливает окраску обеих тканей. Определение накопления сухого вещества в исследуемых тканях показало, что в зависимости от состава питательной среды количество сухих веществ в тканях меняется (табл. 1).

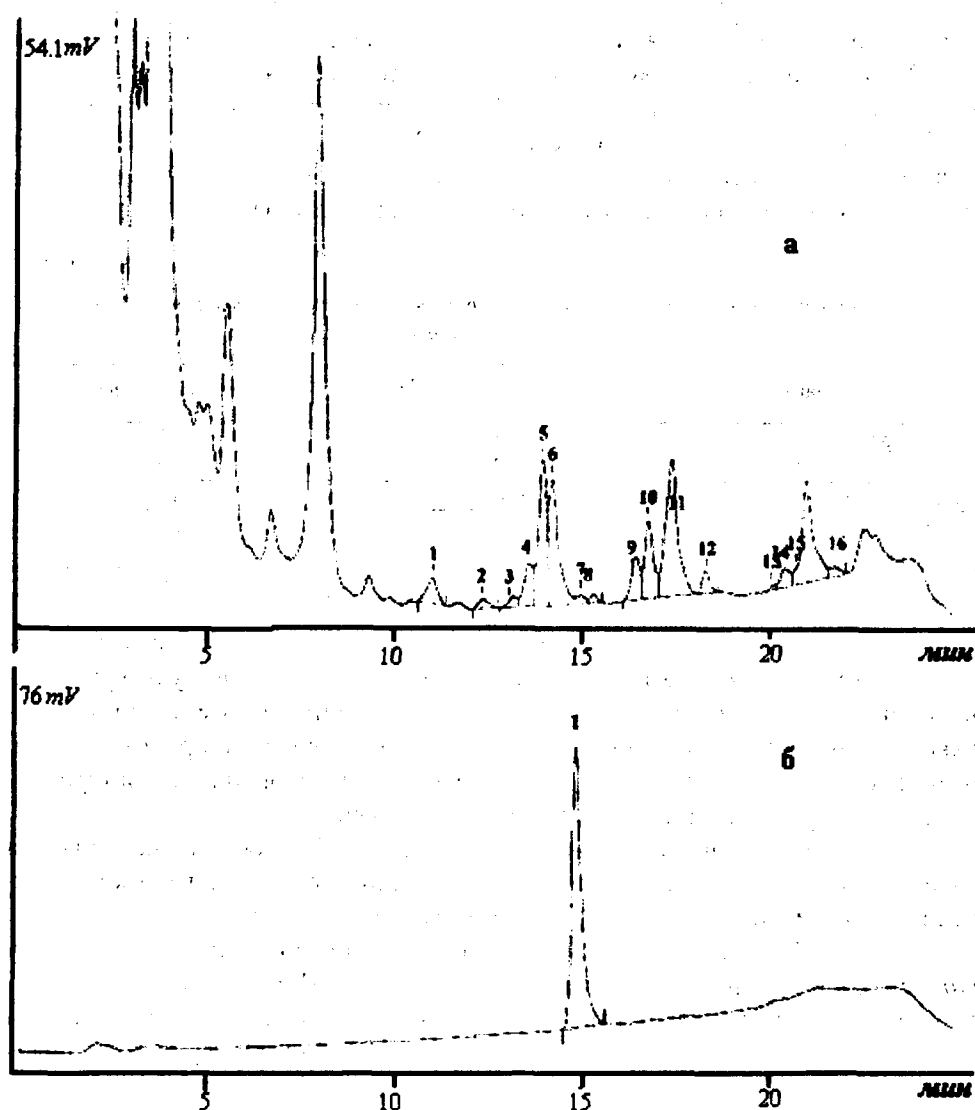
Таблица 1

*Накопление сухого вещества (в %) в каллусных тканях *A. orientalis* в зависимости от происхождения каллуса и состава питательной среды*

Происхождение каллуса	Питательная среда		
	№ 7	Р	№ 5
лист	5,6	9,9	10,8
корень	6,6	11,6	11,2
стебель	5,9	8,25	10,5

Наименьшее количество сухого вещества во всех каллусных тканях отмечалось на среде № 7, а наибольшее – на среде № 5 для тканей листового и стеблевого происхождения и на среде Р для ткани корневого происхождения.

Можно предположить, что такое возрастание сухого веса тканей, сопровождаемое усилением интенсивности окраски каллусов, обусловлено изменением в метаболизме клеток и накоплением в них продуктов вторичного обмена.



Хроматограммы экстракта каллусной ткани алканни корневого происхождения (а) и метчика шиконина (б).

Согласно литературным данным, кора корней *A. orientalis* содержит большое количество красного пигмента [4, 15], однако не указывается его природа. Отмечается наличие нафтохинонового пигмента алканнина в корнях и изолированной культуре только *A. tinctoria* [12, 13, 17]. Поскольку каллусные ткани других представителей семейства *Boraginaceae* синтезируют вещества нафтохиноновой природы [5–11], мы также изучали возможность синтеза нафтохинонов в изолированных тканях *A. orientalis*.

Проведенный спектрофотометрический анализ экстрактов из каллусных тканей алканны показал наличие в них нафтохиноновых пигментов (табл. 2).

На среде Р наибольшее количество нафтохинонов отмечалось у ткани корневого происхождения, а наименьшее – у ткани стеблевого происхождения. Химический анализ экстрактов образцов со среды № 5 показал возрастание количества нафтохинонов в 5 и 8 раз у каллусных тканей листового и стеблевого происхождения соответственно. Поскольку среда № 5 отличается повышенным содержанием БАП, можно предположить, что синтез нафтохиноновых пигментов находится под контролем цитокинина.

Таблица 2

Содержание нафтохинонов в каллусных тканях *A. orientalis* в зависимости от происхождения и состава питательной среды

Вариант	Сумма нафтохинонов, мг/сухой вес	% от сухого веса
лист, среда Р	1,11	0,11
стебель, среда Р	0,93	0,093
корень, среда Р	1,40	0,14
лист, среда № 5	5,50	0,55
стебель, среда № 5	8,10	0,81
корень, среда № 5	1,87	0,187

Анализ качественного состава экстрактов исследуемых образцов проводился методом ВЭЖХ. Как показали результаты, каллусные культуры алканны синтезируют широкий спектр различных соединений (см. рисунок). Однако шиконин обнаружен лишь в образцах тканей корневого происхождения, и то в следовых количествах. За неимением метчиков идентифицировать остальные компоненты не представлялось возможным.

Увеличение концентрации БАП в среде № 5, особенно не влияя на качественный состав синтезируемых соединений, способствовало количественному увеличению основных синтезируемых компонентов.

Таким образом, изолированные ткани алканны восточной в условиях *in vitro* способны к видоспецифическому биосинтезу. При этом процессы биосинтеза вторичных метаболитов в каллусных тканях можно контролировать и направленно регулировать гормональными факторами. Обнаружение шиконина только в каллусной ткани корневого происхождения свидетельствует о тканевой специфичности происходящих биосинтетических процессов.

Институт ботаники НАН РА,
Институт биоорганической химии РАН,
ЕГУ

Поступила 03.02.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 1993, 241 с.
2. Березнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е., Смородин А.В., Смородин В.В., Трофимова Н.А., Шмыкова Н.А. Культура тканей и клеток алкалоидных растений. Томск: Изд-во Томского университета, 1975, 194 с.

3. Носов А.М. – Физиология растений, 1994, т. 41, вып. 6, с. 873–878.
4. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование (кн.5). Под ред. Соколова П.Д. Л.: Наука, 1990, 328 с.
5. Fukui H., Tsukada M., Mizukami H., Tabata M. – Phytochemistry, 1983, v. 22, № 2, p. 453–456.
6. Fukui H., Yoshikawa N., Tabata M. – Phytochemistry, 1984, v. 23, № 2, p. 301–305.
7. Okamoto T., Yazaki K., Tabata M. – Phytochemistry, 1995, v. 38, № 1, p. 83–88.
8. Давыденков В.Н., Патудин А.В., Попов Ю.Г., Рабинович С.А., Мирошников А.И. – Хим.-фарм. журн., 1991, т. 25, с. 53–57.
9. Урманцева В.В., Карягина Т.Б., Черкова Р.В., Муравьева Т.И., Банрамашвили Д.И. – Физиология растений, 1999, т. 46, № 6, с. 855–860.
10. Mizukami H., Ellis B.E. – Plant Cell Report, 1991, № 10, p. 321–324.
11. Tabata M., Mizukami H., Hiraoka N., Konoshima M. – Phytochemistry, 1974, v. 13, p. 927–932.
12. Mita G., Gerardi C., Miceli A., Bollini R., De Leo P. – Plant Cell Report, 1994, № 75, p. 406–410.
13. Urbanek H., Bergier K., Katarzina S., Saniewski M., Patykowski Y. – Plant Cell Report, 1996, № 15, p. 637–641.
14. Murashige T., Skoog F. – Physiol. Plant., 1962, v. 15, № 13, p. 473–479.
15. Бычкова Т.П., Нанинина Е.В., Берзин В.Б., Мирошников А.И. – Биоорганическая химия, 1993, т. 19, № 10, с. 1008–1012.
16. Yamamoto H., Yazaki K., Inoue K. – J. Chromatography B, 2000, № 738, p. 3–15.
17. Золотницкая С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении. Т. 2. Ер.: Изд-во АН Арм. ССР, 1965, 373 с.

Ե. Ն. ՇՇԵՐԲԱԿՈՎԱ, Տ. Բ. ԿԱՐՅԱԳԻՆԱ, ՅՈՒ. Գ. ՊՈՊՈՎ

**ALKANNA ORIENTALIS-Ի ՄԵԿՈՒՍԱՅՎԱՏ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐՈՒՄ
ՆԱՎԹՈՒԹԻՆՈՆՆԵՐԻ ՄԻՆԹԵԶԸ**

Ամփոփում

Ստացվել են խարիի (*Alkanna orientalis*) տերևային, արմատային և ցողունային ծազման կալուսային կուլտուրաներ: Մենդամիջավայրում ցիտոկինինների պարունակության բարձրացումը նպաստում է սինթեզվող պիգմենտների քանակի ավելացմանը: Բարձր էֆեկտիվության հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով արմատային ծազման կալուսային հյուսվածքներում հայտնաբերվել է շիկոնին:

E. N. SHCHERBAKOVA, T. B. KARYAGINA, Yu. G. POPOV

**SYNTHESIS OF NAPHTHOQUINONES IN THE ISOLATED CULTURE
OF ALKANNA ORIENTALIS**

Summary

Callus cultures of alkanet (*Alkanna orientalis*) of leaf, root and stalk origin able to synthesize naphthoquinones are obtained. Increase of cytokinin content in the nutrient medium promotes to synthesize pigments' quantity rising. In callus culture of root origin by means of HPLC the shikonin was identified.