

Накопление шиконина и цитологические особенности высокопродуктивного клеточного штамма *Arnebia euchroma* при поверхностном и глубинном выращивании

О. А. Поронник, В. А. Кунах, В. И. Адонин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Изучен новый клеточный штамм A. euchroma АЕ-3, накапливающий около 80 мг шиконина на 1 л среды за сутки при выращивании в суспензионной культуре и около 100 мг — при выращивании на агаризованной среде. Исследование размеров клеток и ядер, их морфологии, митотической активности, числа хромосом, уровня и типов aberrаций хромосом не показало существенных отличий при разных условиях выращивания. Штамм является миксополиплоидным с модальным числом 32 хромосомы при размахе изменчивости по числу хромосом от 10 до 130. Он характеризуется сравнительно невысоким уровнем анафазных aberrаций хромосом (около 6 %). Сравнение различных клеточных линий A. euchroma не обнаружило связи между их продуктивностью, а также цитологическими и цитогенетическими особенностями.

Введение. Источником ценного для косметики, пищевой промышленности и медицины растительного нафтохинонового пигмента шиконина сегодня являются культивируемые клетки воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon*. Впервые технология получения шиконина из культуры клеток была разработана в Японии [1]. Продуктивность японских клеточных линий достигает 200 мг/г от сухой ткани.

Ведутся исследования с культивируемыми клетками и других видов растений семейства *Boraginaceae* для получения клеточных линий, продуцирующих шиконин, цена которого на мировом рынке составляет более 4000 долларов США за 1 кг. Известно, что подобные работы выполнены на каллусных культурах *Echium licopsis* [2], *Onosma paniculatum* [3], *Onosma visianii* [4], *Onosma confertum* [5]. Однако накопление шиконина в этих культурах было низким: 5,8 мг/г сухой клеточной биомассы у *O. paniculatum* [6], 5,2 мг/г — у *O. visianii* [4], 3,5 мг/г — у *E. licopsis* [2].

В отделе генетики клеточных популяций Института молекулярной биологии и генетики НАН

Украины в результате длительных исследований были получены новые клеточные линии и штаммы арнебии красящей *A. euchroma*. Один из таких штаммов, АЕ-3, накапливает 8—15 % (80—150 мг/г) шиконина от массы сухой ткани [7]. На сегодня это наивысшая в мире продуктивность для арнебии красящей. По накоплению шиконина она превышает интактные растения в 10 раз и приближается по продуктивности к лучшим клеточным линиям воробейника краснокорневого.

В настоящей работе приведены результаты изучения роста, накопления шиконина и цитологические особенности клеточного штамма АЕ-3.

Материалы и методы. Генеалогия, способ получения и некоторые особенности штамма АЕ-3 изложены в нашем предыдущем сообщении [7]. Штамм выращивали как в жидкой, так и на агаризованной модифицированной питательной среде Линсмаера и Скуга по [8]. Суспензионную культуру выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды, при температуре 24—26 °С в режиме постоянного перемешивания (80—100 об/мин) с интервалом пересадок 14 дней. Размер инокулята 2,5 г в пересчете на сухую биомассу на 1 л среды.

Каллусную культуру выращивали на питательной среде того же состава с добавлением агара в количестве 6—8 г на 1 л среды, в колбах объемом 100 мл. Размер инокулята и длительность пассажа такие же, как для суспензии. Как для жидкой, так и для агаризованной питательной среды величина рН равна 5,9. Динамику роста культуры изучали, определяя сухую массу ткани.

Содержание шиконина определяли по следующей методике: аликвоты клеточной суспензии исчерпывающе экстрагировали подкисленным спиртом (1 мл конц. H_2SO_4 на 1 л $EtOH$), добавляли свежие порции спирта. Объединенные спиртовые экстракты обрабатывали гексаном и энергично встряхивали в течение 5 мин. Пигменты, находящиеся в гексане, гидролизуют 5 %-м раствором КОН. Щелочные растворы анализировали фотокolorиметрически. Стандартом служил щелочной раствор аутентичного шиконина.

Для цитологического анализа фиксацию проводили через 1—3 дня. Ткань фиксировали в ацетоалкоголе (1:3) и готовили временные ацетоорсеиновые препараты по методике [9]. Для определения митотического индекса в каждой точке фиксации отбирали ткань в 8—10 ч утра, анализировали 5—10 тыс. клеток на 5—6 препаратах из разных участков ткани, одновременно подсчитывали число хромосом в метафазах, вели учет анафазных аберраций хромосом. Размер клеток и ядер определяли с помощью окуляр-микрометра.

Исследования осуществляли в течение 20 дней при длительности пассажа 14 дней как для каллуса, так и для суспензии.

Все опыты были проведены не менее чем в трех повторностях и в разное время года — зимой, весной, летом. Полученные данные статистически обработаны с использованием дисперсионного, корреляционного методов оценки (определяли средние значения, стандартные отклонения, ошибки средних, коэффициенты корреляции).

Результаты и обсуждение. Штамм АЕ-3 получен в результате длительной визуальной селекции мелких клеточных агрегатов из исходной линии АЕ-1. Аналогично была получена и менее продуктивная клеточная линия — АЕ-2 [7]. По продуктивности штамм АЕ-3 более чем в три раза превосходит родственную линию АЕ-2 и более чем в 10 раз — исходную линию АЕ-1 [7].

Суспензионная культура штамма АЕ-3 состояла из клеток и клеточных агрегатов, окрашенных в разные оттенки красного цвета — от темно-розового до красно-бурого.

Каллусная культура состояла из более крупных и плотных агрегатов размером до 0,7—0,8 см

в диаметре и имела более интенсивную красно-бурую окраску.

Штамм АЕ-3 как при глубинном выращивании, так и при выращивании на твердой среде характеризовался сильным темпом роста. Его рост для суспензии описывается S-образной кривой с выходом на плато на 10—12-е сут (рис. 1, а), для каллуса (с двумя выходами на плато) — на 5—9-е и на 14—16-е сут роста (рис. 1, б). В целом выход сухой биомассы как в суспензии, так и в каллусе достигал 20 г/л (рис. 1, а, б).

По-иному происходил процесс накопления шиконина. В течение первых суток роста его содержание в биомассе снижалось, а затем возрастало, достигая максимума для суспензии — 65 мг/г шиконина в сухой ткани на 11-е сут роста (рис. 1, в), а для каллуса — 155 мг/г на 17-е сут (рис. 1, г). При этом обращает на себя внимание труднообъяснимый волнообразный характер кривых накопления шиконина: наблюдали падение содержания шиконина в биомассе не только в первые дни роста и при удлинении срока выращивания клеток без пересадок на свежую среду, но и в середине пассажа, в частности, на 7-й день роста (рис. 1, в, г).

По морфологии клеток и ядер в течение первых 10 сут роста суспензионная и каллусная культуры существенно не различались. В них преобладали слабодифференцированные клетки округлой и овальной формы размером от 30 до 270 мкм. Клеточные ядра были округлыми, размер их варьировал от 6 до 30 мкм. Они содержали, как правило, 1—2 ядрышка (рис. 2, а). Начиная с 11-х сут в каллусной ткани по сравнению с суспензионной со значительно большей частотой встречались элементы тканевой дифференциации в виде трахеид (рис. 2, б, в) и клетки с ядрами различной формы: плоские, перфорированные, лентовидные. Возрастала частота двуядерных клеток (до 10—12 %), а также клеток с лопастными ядрами. В суспензии подобная картина наблюдалась, как правило, в стареющей культуре, т. е. после 14—15 сут роста при длительности пассажа 14 сут. Динамика средних размеров клеток и ядер в течение пассажа в каллусе и суспензии была сходной. Эти результаты представлены на рис. 3, 4.

Изучение митотической активности показало отсутствие заметного латентного периода и сравнительно невысокую частоту клеточных делений в изученных точках в течение всего цикла выращивания, которая даже в максимумах не превышала 3 %. Как в суспензионной, так и в каллусной культуре отмечено несколько подъемов митотического индекса. Характер кривых митотической активности во всех изученных случаях был подо-

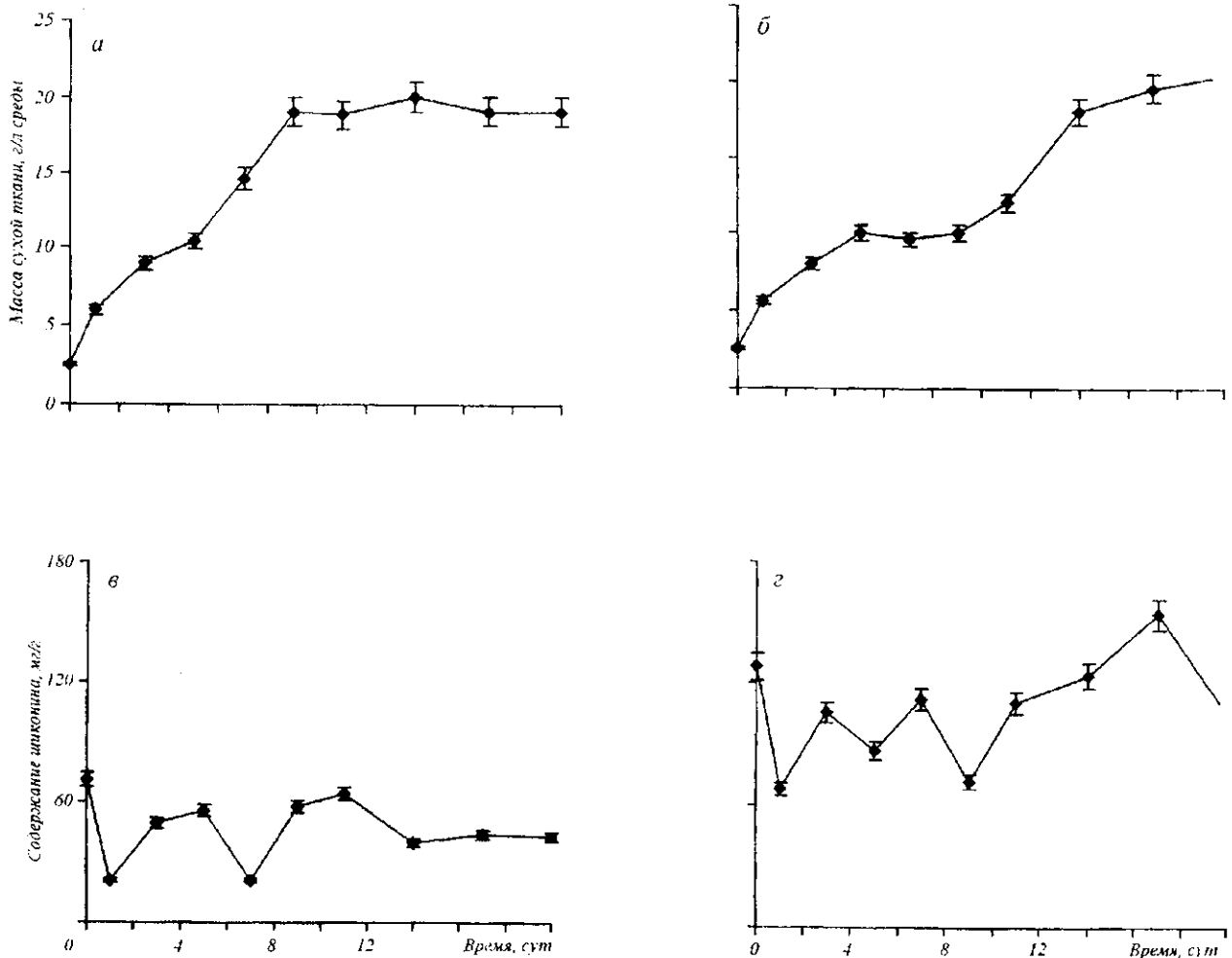


Рис. 1. Выход сухой биомассы (а, б) и накопление шиконина (в, г) в суспензионной (а, в) и каллусной (б, г) культуре *A. euchroma*, штамм АЕ-3

бным. В течение пассажа наблюдали 1—2 подъема числа митозов в суспензионной культуре (рис. 5, а, б) и 2—3 — в каллусной (рис. 5, в, г). Максимумы митотической активности отмечены в первые 3—7 дней роста.

Заметное влияние на время выявления подъемов числа митозов оказывал уровень митотической активности в исходном экспланте, т. е. в нулевой точке пассажа — при более низкой начальной митотической активности подъемы выражены четче, в культуре резче выявляется синхронность вступления клеток в митоз (рис. 5, а, в, б, г).

В исследуемой культуре число хромосом в клетках варьировало в широких пределах — от 10 до 130. В доступной литературе мы не нашли сведений о хромосомном числе арнебии красящей. Вместе с тем имеются сведения о том, что для трех средне- и южно-азиатских видов рода *Arnebia* *A. decumbens*, *A. griffithii* и *A. hispidissima* $2n = 8$ [10], а для вида *A. echioides* $2n = 12$ [11]. Вероятно, основное число хромосом для рода *Arnebia* равно или кратно 4 ($x = 4$). В изученной нами культуре клеток *A. euchroma* более часто встречались клетки с числом хромосом, кратным 4. Исходя из этого



Рис. 2. Общий вид клеток. (а) — элементы клеточной дифференциации (б, в) — *D. dichroma*, пассаж АЕ-3

полученные данные были сведены в группы (классы) с классовым промежутком $i = 4$.

Цитогенетический анализ показал, что распределение клеток по числу хромосом в изученной

культуре как при глубинном (рис. 6, а), так и при поверхностном (рис. 6, б) выращивании было сходным. Не наблюдали достоверных отличий и при изучении разных пассажей, а также при изучении

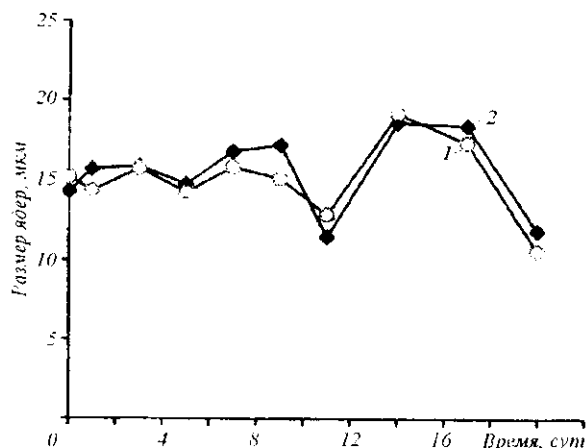


Рис. 3. Динамика среднего размера клеточных ядер в каллусной (1) и суспензионной (2) культурах *A. euschroma*, штамм АЕ-3

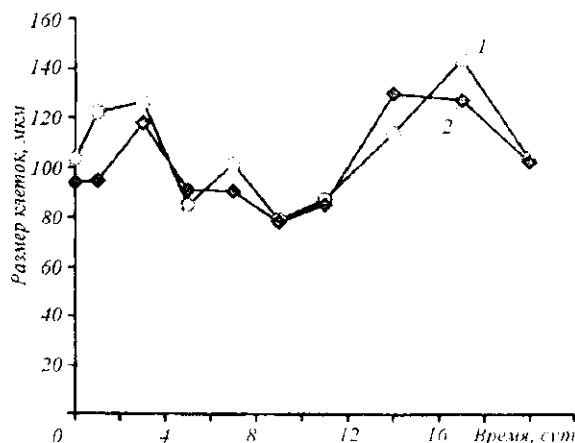


Рис. 4. Динамика среднего размера клеток в каллусной (1) и суспензионной (2) культурах *A. euschroma*, штамм АЕ-3

Таблица 1
Уровень и типы aberrаций хромосом в клеточном штамме АЕ-3 *A. euschroma*.

Количество изученных анафаз, шт	Анафазы с aberrациями		Тип aberrаций, % от суммы aberrантных анафаз									
			Мосты без фрагментов						Мосты с фрагментами		Фрагменты	
	Одиночные		Парные		Комбинированные							
	шт	%	шт	%	шт	%	шт	%	шт	%	шт	%
<i>Суспензионная культура</i>												
248	18	7,3±1,6	11	61,1	1	5,6	3	16,7	2	11,1	1	5,6
<i>Каллусная культура</i>												
164	5	3,0±1,3	3	60,0	1	20,0	--	--	--	--	1	20,0
<i>Суммарные данные</i>												
412	23	5,6±1,1	14	60,8±10,2	2	8,7±5,9	3	13,1±7,0	2	8,7±5,9	2	8,7±5,9

динамики ploидности в течение пассажа. Поэтому на рис. 6, в, представлены суммарные данные, характеризующие изученную популяцию в целом.

Изученный штамм являлся миксоploидной популяцией. Распределение клеток по числу хромосом было близким к нормальному (рис. 6). Модальные классы формировали клетки, содержащие от

30 до 37 хромосом (рис. 6, 7), которые составляли более 60 % популяции. Модальным числом были 32 хромосомы, частота клеток с этим числом достигала 30 %.

Изучение уровня и типов aberrаций хромосом в анафазах показало сравнительно низкий для культивируемых клеток уровень мутирования: око-

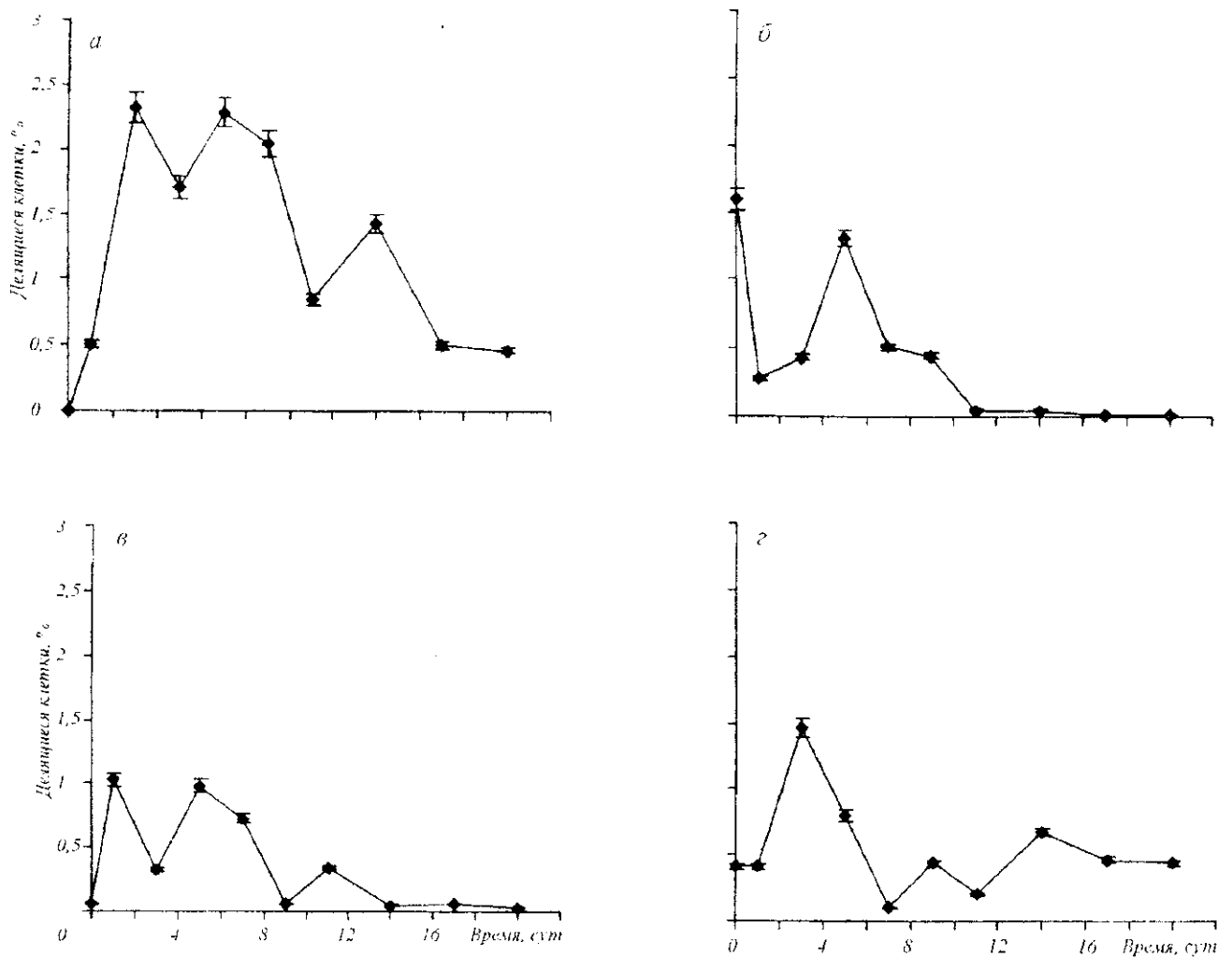


Рис. 5. Динамика митотической активности штамма АЕ-3 *A. eichroma* при его выращивании в жидкой (а, б) и на агаризованной (в, г) питательных средах

до 3 % aberrантных анафаз в каллусной культуре и около 7 % — в суспензионной (разница была недостоверной — $t_{dif} = 1,4$), что в среднем составило менее 6 %. Учитывая, что более 80 % aberrаций составляли мосты без фрагментов (среди них более 2/3 — одиночные мосты), истинный уровень возникновения «свежих» разрывов хромосом составлял менее 1 % (табл. 1). Остальные перестройки — это aberrации, переходящие из митоза в митоз благодаря циклу разрыв—слияние—мост. (Детально этот процесс и его роль в общем уровне мутирования хромосом в популяциях культивируемых клеток растений описан в [12].) Как в каллу-

се, так и в суспензии наблюдали, кроме нормальных митозов, подобные амитозу фигуры, число которых увеличивалось с возрастом культуры.

Как уже отмечалось, высокопродуктивный клеточный штамм АЕ-3 получен параллельно с продуктивной линией АЕ-2 из исходной линии АЕ-1. Данные о продуктивности и некоторых цитологических параметрах этих клеточных линий приведены в табл. 2. Сравнительный анализ не дал возможности сделать обоснованное заключение о какой-либо связи продуктивности с цитологическими особенностями конкретной клеточной линии. Можно лишь констатировать, что повышенная или

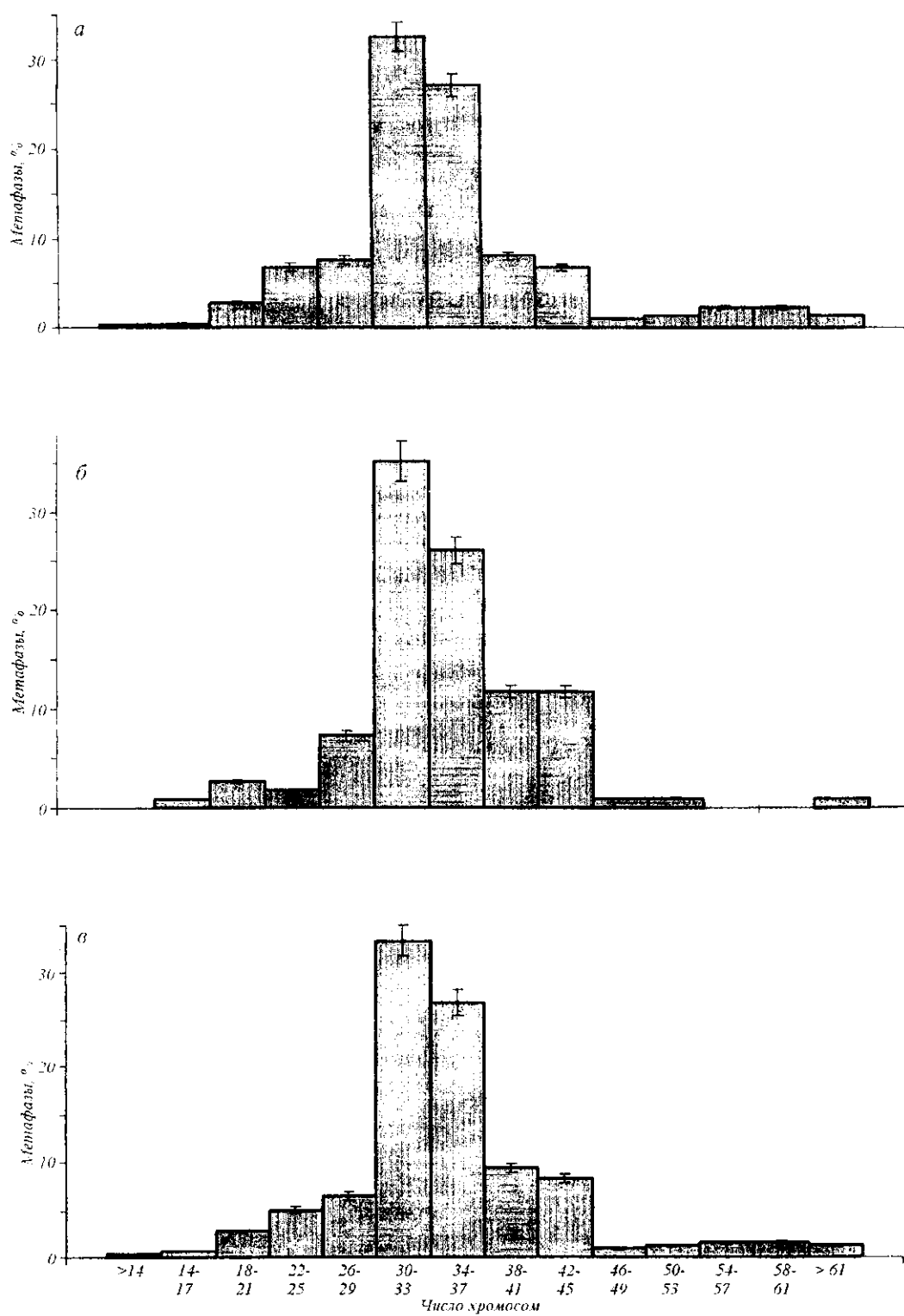


Рис. 6. Распределение культивируемых клеток штамма АЕ-3 *A. euchroma* по числу хромосом: а — суспензионная культура ($n = 225$); б — каллусная культура ($n = 111$); в — суммарное распределение ($n = 336$); n — число изученных метафаз

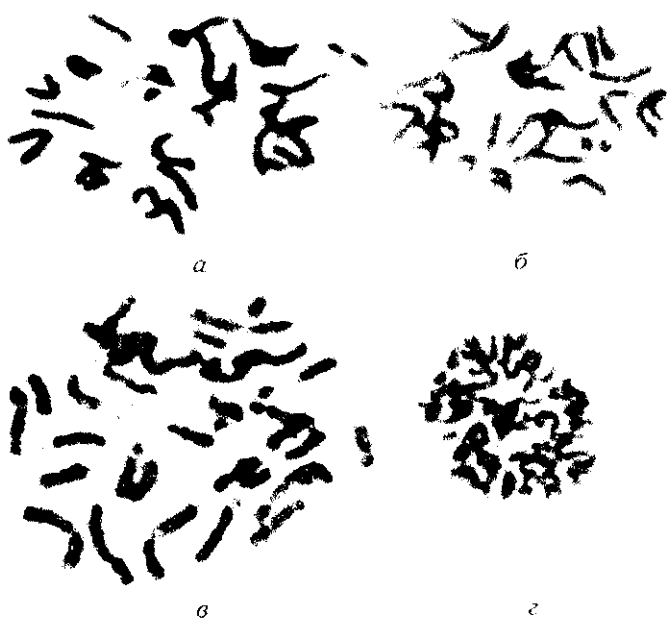


Рис. 7. Метафазы с разным числом хромосом: а — 28; б — 32; в — 36; з — около 60

Установлено, что продуктивность клеточной линии другого растения — раувольфии змеиной, накапливающего противоритмический алкалоид аймалин, в значительной мере коррелировала с уровнем плоидности и количеством ДНК в клеточных ядрах. Разные клеточные линии и штаммы этого растения, особенно различающиеся уровнем накапливаемого аймалина, существенно отличались между собой как цитологически, так и биохимически, в том числе по электрофоретическому спектру суммарных белков и некоторых ферментов [13, 14]. В то же время у чайного растения повышение уровня плоидности культивируемых клеток сопровождалось снижением способности к накоплению фенольных соединений [15]. У арнебии красящей существенных различий между клеточными линиями не наблюдали. Это может свидетельствовать о разных механизмах регуляции биосинтеза аймалина в клеточных линиях раувольфии, шиконина — у арнебии и фенольных соединений — у чайных растений.

Таблица 2
Продуктивность и некоторые цитологические характеристики родственных клеточных линий *A. cichroma*

Клеточная линия, штамм	Продуктивность			Клетки с модальным числом хромосом		Анафазные aberrации хромосом, %	Размер клеток, мкм		Размер ядерных ядер, мкм	
	Выход сухой биомассы, г/л	Содержание шиконина в сухой биомассе, мг/г	Накопление шиконина, мг/л за 1 сут	Модальное число хромосом	Клетки, %		Размер	Размер ядерных ядер	Размер	Средний размер
АЕ-1*, суспензия	10—12	8	6.3	32	30	14,5	25—236	48	—	17
АЕ-2*, суспензия	10—14	12—25	10,2—23,2	24	25—30	30,0	12—188	50	6—32	18
АЕ-3, суспензия	17—20	40—80	40,0—80,0	32	25—30	7,3	32—269	49—75	7—29	18
АЕ-3, каллус	17—20	70—150	50—107,1	32	25—30	3,0	28—267	34—104	6—30	17

Примечание. *Данные взяты из работы [7].

низкая продуктивность не коррелировала ни с уровнем хромосомной изменчивости, ни со степенью дифференциации клеток, ни с другими цитологическими параметрами. Не было установлено также различий между изученными клеточными линиями и при изучении электрофоретического спектра изоформ некоторых ферментов — эстераз, фосфатаз, амилаз (неопубликованные данные).

Выводы. Клеточный штамм АЕ-3 арнебии красящей накапливал в течение 14—16 сут роста как на твердой, так и в жидкой питательной среде 17—20 г/л сухой биомассы. Накопление шиконина в биомассе достигало в пересчете на 1 л среды 80 мг за 1 сут для суспензии и до 107 мг за 1 сут в каллусе. Культура состояла из окрашенных в красно-бурый цвет клеток и клеточных агрегатов

размером около 0,7 см. Клетки имели круглую и овальную форму, их размеры в каллусной культуре колеблются в пределах от 28 до 267 мкм; в суспензионной культуре — 32—269 мкм. Размер ядер варьировал от 6 до 30 мкм.

Кривая митотической активности характеризовалась 1—2 подъемами в суспензионной культуре и 2—3 подъемами — в каллусной с пиками в первые 3—7 дней роста.

Изученная линия являлась миксоплоидной с размахом изменчивости по числу хромосом от 10 до 130. Клетки, содержащие 32 хромосомы, составляли 30 % популяции. Частота aberrаций хромосом в анафазе митоза составляла менее 6 %, при этом анафазы со «свежими» разрывами хромосом — менее 1 %.

Не установлена зависимость продуктивности суспензионной и каллусной культур от их цитологических особенностей. Продуктивность зависела от условий выращивания клеточных линий — на твердой среде биосинтез шиконина на 50 % выше.

Полученный штамм можно рекомендовать как перспективный источник промышленного получения шиконина.

O. O. Poronnyk, V. A. Kunakh, V. I. Adonin

Накоплення шиконіна і цитологічні особливості високопродуктивної клітинного штаму *Arnebia euchroma* при поверхневому та глибинному вирощуванні

Резюме

Вивчено новий клітинний штаму *A. euchroma* АЕ-3, що накопичує близько 80 мг шиконіна на 1 л середовища за добу при вирощуванні в суспензійній культурі і близько 100 мг — при вирощуванні на агаризованому середовищі. Дослідження розмірів клітин та ядер, їхньої морфології, митотичної активності, числа хромосом, рівня і типів aberrаций хромосом не виявило суттєвих відмінностей за різних умов вирощування. Штаму є миксоплоїдним з модальним числом 32 хромосоми та размахом мінливості за числом хромосом від 10 до 130. Він характеризується невисоким рівнем анафазних aberrаций хромосом (близько 6 %). Порівняння різних клітинних ліній *A. euchroma* не виявило зв'язку між їхньою продуктивністю та цитологічними і цитогенетичними особливостями.

O. A. Poronnyk, V. A. Kunakh, V. I. Adonin

Shikonin accumulation and cytological peculiarities of highly productive *Arnebia euchroma* cell strain upon surface and submerged maintenance

Summary

A. euchroma novel cell strain АЕ-3, accumulating about 80 and 100 mg/l shikonin per day upon maintenance in suspension culture and on agarized medium, respectively, has been studied. The study on cell and nucleus size, their morphology, evaluation of mitotic activity, chromosome number, level and types of their aberration failed to demonstrate any essential difference under the various

conditions of maintenance. The strain appears to be mixoploid showing chromosome variation range from 10 to 130 chromosomes with modal classes formed by cells carrying 30 to 37 chromosomes and characterized by low level of anaphase chromosome aberration (about 6 %). Comparison of various *A. euchroma* cell lines has not revealed any relationship between their productivity and cytological and cytogenetic peculiarities.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tabata M., Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures // *Biotechnology in plant sci. relevance to agriculture in eighties.*—New York: Acad press, 1985.—P. 207—218.
2. Fukui H., Tsukada M., Mizukami H., Tabata M. Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus cultures // *Phytochemistry.*—1983.—22. N 2.—P. 453—456.
3. Zhu R., Cao R., Wang M., Pan D., Du Z., Lu W., Shi Y. Темно-красный пигмент, образующийся в каллусах *Onosma paniculatum* // *Acta bot. Sin.*—1990.—32, N 10.—P. 315—320.
4. Щербановский Л. Р., Шубина Л. С., Щербановская Ф. Р. Нафтохиноны высших растений // *Растительные ресурсы.*—1971.—7. № 4.—С. 606—615.
5. Ai K., Li F., Li Y., Wang W., Wu Y. Изучение нафтохиноновых компонентов *Onosma confertum* и количественное определение шиконина // *Acta bot. Sin.*—1989.—31, N 7.—С. 549—553.
6. Zhou L., Zheng G., Wang S. Культура каллуса и образование шиконина *Onosma paniculatum* // *Acta bot. Yunnanica.*—1991.—13, N 3.—С. 749—753.
7. Кунах В. А., Поронник О. А., Захленюк О. В., Адонин В. И. Получение и характеристика новых клеточных линий арнебии красящей *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst., продуцирующих шиконин // *Физиология и биохимия культурных растений.*—1999.—31, № 3.—С. 208—213.
8. 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. журн.*—1991.—№ 1.—С. 53—55.
9. Кунах В. А., Левенко Б. А. Модификация метода давленных препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // *Цитология и генетика.*—1975.—9, № 3.—С. 56—58.
10. Хромосомные числа цветковых растений / Под ред. А. А. Федорова.—Л.: Наука, 1969.—926 с.
11. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР / Под ред. А. Л. Тахтаджяна.—Л.: Наука, 1990.—508 с.
12. Кунах В. А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // *Успехи соврем. генетики.*—М.: Наука, 1984.—Вып 12.—С. 30—62.
13. Кунах В. А. Геномная изменчивость и накопление индолоидных алкалоидов в культуре клеток раувольфии амеинной, *Rauwolfia serpentina* Benth // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 1.—С. 3—30.
14. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // *Biotechnol. Agr. and Forest.*—1996.—36.—P. 315—332.
15. Загоскина Н. В., Федосеева В. Г., Фролова Л. В., Азиренкова Н. В., Запрометов М. Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень плоидности, образование фенольных соединений // *Физиология растений.*—1994.—41, № 5.—С. 762—767.

УДК 581.143.6:575.5+663.1
Поступила в редакцию 02.06.99