

ОДЕРЖАННЯ КУЛЬТУРИ ТКАНИН СИНЯКА ПОДОРОЖНИКОВОГО (*Echium plantagineum* L.) — ПРОДУЦЕНТА ШИКОНІНОВИХ ПІГМЕНТІВ

Пороннік О. О.

Шаблій В. А.

Кунах В. А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: oksana_poronnik@ukr.net

Одержано культуру тканин *E. plantagineum* із корінців насінневих проростків на агаризованому живильному середовищі 5C01. Культивування на живильному середовищі LS-м ініціювало біосинтез червоних шиконінових пігментів. Відселектовано варіант калусної культури (ЗЕр), що накопичує 2,11% похідних шиконіну від сухої біомаси, вихід якої на 14-ту добу росту становить 16 г/л живильного середовища. Методами тонкошарової хроматографії (на пластинках Sorbfill УФ 254) та хроматографії на колонці (Silica gel 60) досліджено спектр шиконінових похідних у процесі становлення культури. Встановлено, що органогенна культура на перших етапах культивування на живильному середовищі LS-м разом із червоними фракціями шиконінових пігментів синтезувала й сині. Проте через 1,5 року культивування клітини калусу синяка синтезували тільки червоні фракції шиконінових пігментів.

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

Синяк подорожниковий — *Echium plantagineum* L. (*E. lycopsis* L.) належить до родини *Boraginaceae*, представники якої здавна привертають увагу як лікарські, барвні, алкалоїдовмісні, глікозидовмісні, вітамінні, ефіроолійні, кормові, харчові та декоративні рослини [1].

E. plantagineum — трав'яниста рослина дворічник, 20–60 см заввишки. Зростає переважно в Криму, на Кавказі та Західному Закавказзі. Підземна частина рослини містить від 0,17 до 0,35% 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 нетоксичні та перспективні для використання їх як дефіцитних природних харчових червоних барвників, оскільки застосовувані наразі антоціани є нестійкими. Синтетичні ж сполуки визначено шкідливими [5].

Природна рослинна сировина для одержання нафтохінонових пігментів у промислових масштабах в Україні відсутня. Шиконін японського виробництва, що його одержують із культури тканин горобинника червонокореневого, є досить дорогим. Ціна його на світовому ринку сягає 4 500 дол. США за 1 кг.

Нами запропоновано культуру тканин *E. plantagineum* як джерело сировини для отримання червоних шиконінових пігментів. Перспективним є розроблення промислової біотехнології одержання шиконінових похідних.

Матеріали і методи

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

Знезаражування. Знезаражування насіння проводили за допомогою хлоровмісної рідини «Купава» та етилового спирту за такою методикою: насіння заливали 25%-м розчином «Купави» з додаванням поверхнево-активної речовини TWEEN (0,2 мл на 100 мл) для кращого змочування насіння. Знезаражування тривало 20 хв за постійного перемішування. Насіння тричі відмивали стерильною дистильованою водою і переносили в 96% -й C_2H_5OH на 2 хв, після чого ще двічі відмивали дистиллятом. Далі в стерильних умовах насіння переносили в маленькі пробірки з живильним середовищем (по одній насінині) для проростання.

Культивування. Культуру тканин отримували з насінневих проростків на агаризо-

ваному живильному середовищі з мінеральною основою, розробленою А. Г. Волосовичем зі співавторами (1979). Склад використаного варіанта середовища 5C01 див. [6].

Біосинтез шиконінових пігментів ініціювали на модифікованому середовищі Лінсмайер–Скуга (LS-м) [7].

Пророщували насіння та ініціювали калюсоутворення у пробірках об'ємом 30 мл, що містили 5 мл агаризованого живильного середовища. Отриману культуру тканин *E. plantagineum* вирощували в плоскодонних колбах об'ємом 100 мл, що містили 25 мл середовища, при температурі 25–27 °С без освітлення за відносної вологості повітря 70–80%.

Усі матеріали і складові живильних середовищ були вітчизняного виробництва.

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 [8].

Матеріали та обладнання для біохімічних досліджень. Для рідинної хроматографії використовували Silica gel 60 (Merck, Німеччина), пластинки для тонкошарової хроматографії Silufoll (Czechlab, Чехія) та Sorbfill (Росія), Al_2O_3 (Czechlab, Чехія). Хроматографію проводили на хроматографі LKB Bromma (8300 Uvicord II, Чехія). Для спектрофотометричного аналізу застосовували спектрофотометр Specord UV VIS (Carl Zeiss Jena), кількісний вміст шиконіну визначали на фотоелектрокалориметрі Фотометр КФК-3. Решта реактивів — вітчизняного виробництва.

Методи біохімічних досліджень

Екстракція. Висушену до повітряно-сухого стану при температурі 40 °С і подрібнену біомасу вичерпно екстрагували етанолом в апараті Сокслета, екстракт упарювали в ротаційному випарювачі. Залишок заливали етанолом при температурі 50–70 °С. Ресуспендували і змивали розчинником шиконіновий осад зі стінок колби. Готували 2–3% -й етанольний розчин $Cu(OAc)_2$ або $CuCO_3$ і додавали його до розчину шиконінових похідних, прогрівали 3 хв при температурі 50–60 °С. Фільтрували розчин на скляному фільтрі під водострумним насосом. Фільтрат промивали етанолом, ацетоном, гексаном. Темно-фіолетовий осад висушували і обробляли розведеною HCl (5–10%).

Промивали дистильованою водою і елюювали похідні шиконіну гексаном в іншу колбу Бунзена.

Кількісний аналіз шиконінових пігментів. Оцінюючи кількісний вміст шиконіну та його ефірів у екстрактах калюсів, використовували фотоелектроколориметричний метод аналізу. Для досягнення цієї мети ми отримали калібрувальну криву, побудовану за наважками очищених нафтохінонів. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі $\lambda = 526$ нм ($\log e_{526} = 3,87$) в етанолі [7].

Адсорбційна хроматографія на силікагелі. Колонки розміром 1,5×7,0 набивали Silica gel 60 у хлороформі, зрівноважували системою розчинників гексан — етилацетат (50:1) до повної стабілізації базової лінії. Зразок сухої тканини масою 400 мкг наносили на колонку в гексані й елюювали в ступінчастому градієнті системи розчинників гексан — етилацетат у співвідношеннях: 50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 0:1. Отримували сім фракцій, які аналізували методом тонкошарової хроматографії. Фракції I і II мали жовте забарвлення (жовті пігменти), відповідно фракції III, IV і V — червоне забарвлення (червоні пігменти), останні дві фракції — синє забарвлення (сині пігменти).

Було розроблено умови швидкого виділення фракцій синіх пігментів. До етанольного екстракту культури тканин додавали 2–3% етанольного розчину $Cu(OAc)_2$, прогрівали 3 хв при температурі 50–60 °С до повного осадження червоних пігментів, після чого наносили екстракт на колонку розміром 1,5×7,0 (Silica gel 60). Елюцію проводили ступінчасто системами бензол — етилацетат — оцтова кислота у співвідношеннях 3:1:0,1 і 3:1:0,2. Отримали дві фракції: перша — розчин комплексу солей міді з червоними пігментами, друга — із синіми пігментами.

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) здійснювали на пластинках Sorbfill УФ 254 у системі розчинників гексан – етилацетат – оцтова кислота, 100:15:1 [9].

Гідроліз шиконінових похідних. Гексановий розчин шиконінових похідних змішували з 0,1 н. $NaOH$, ресуспендували. Пігменти кількісно переходили з гексану в луг, забарвлюючи його в інтенсивно-блакитний колір. $NaOH$ нейтралізували 0,1 н. HCl і екстрагували похідні шиконіну петролейним ефіром у ділильній воронці.

Спектральний аналіз. Кожну фракцію, яку в чистому вигляді було виділено із колонки, висушували у роторному випарювачі, перерозчиняли у рівних об'ємах етанолу і вносили до вимірювального приладу.

Аналіз проводили у двох режимах: перший — при ультрафіолетовому освітленні (200–300 нм), другий — у видимій частині спектра (300–700 нм).

Статистична обробка. Застосовували загальноприйнятий метод варіаційної статистики [10]. Обчислення критерію Стьюдента виконували на ПК за допомогою програми Origin.

Результати та обговорення

Одержання первинних калюсів. Первинні калюси одержали з корінців насінневих проростків синяка подорожничкового на середовищі 5C01, яке розроблено для рослинних культур тканин-суперпродуцентів [6].

Перші проростки синяка з'явилися через місяць після перенесення на живильне середовище. З 35 насінин утворилося 6 проростків. Проростки довжиною 2–3 см, що перебували на живильному середовищі того самого складу і торкались поверхні середовища, протягом 1–2 днів утворили калюс (варіанти 1Ер, 2Ер, 3Ер, 4Ер та 6Ер). Одна з насінин дала карликову рослину розміром 3 мм, яка на середовищі 5C01 упродовж тривалого часу не росла і не розвивалась. І тільки через два місяці утворився первинний калюс (варіант 5Ер). Первинні калюси, утворені з проростків різних насінин синяка, на початку культивування були ідентичними. Вони склалися із світло-коричневих клітинних агрегатів розміром 2–3 мм (рис. 1, а). Однак через три пасажі варіант 1Ер загинув.

Через чотири місяці культивування первинний калюс було перенесено на живильне середовище LS-м, розроблене для рослинних культур тканин, що продукують шиконін [7] (рис. 1, б). Адаптація всіх варіантів куль-

тури пройшла відмінно. Культура активно росла, спостерігали також окремі червоно забарвлені мікроділянки калюсу. Калюс був відносно щільним, складався з клітинних агрегатів (глобул) розміром 1–3 мм.

Протягом другого пасажу на середовищі LS-м спостерігали масове утворення дрібних ниткоподібних корінців. Поверхневий шар цих корінців наприкінці пасажу синтезував невелику кількість шиконіну, про що свідчило червоне забарвлення. Калюс при цьому також набув бурого забарвлення (рис. 1, в). Утворення корінців можна пояснити дією індолілоцтової кислоти (ІОК), що входить до складу середовища LS-м. Відомо, що невисока концентрація ІОК (0,28–0,3 мг/л) спричинює ризогенез [11]. У цей період нами проведено первинний добір культури на підвищений вміст шиконіну за допомогою рідкого парафіну [8]. Як найперспективніший за вмістом шиконіну й інтенсивністю росту визначено варіант калюсу 3Ер, який утворював найменше корінців (рис. 2).

Отримані з різних насінин калюсні тканини синяка мали значні фенотипні відмінності (табл. 1). Порівняльні дані з продуктивності за похідними шиконіну подано в табл. 2. Через 20 пасажів варіант 5Ер загинув.

Відселектований калюс культури *E. plantagineum* 3Ер накопичує 2,11% шиконіну на суху масу, маючи приріст біомаси 16 г/л за тривалості пасажу 14 діб. Саме цей варіант отриманої калюсної культури тканин синяка використаний нами в подальшому для вирощування у вигляді суспензії, що є проміжним етапом у створенні біотехнології одержання червоних пігментів.

Біохімія вторинних метаболітів. Під час становлення культури тканин рослини

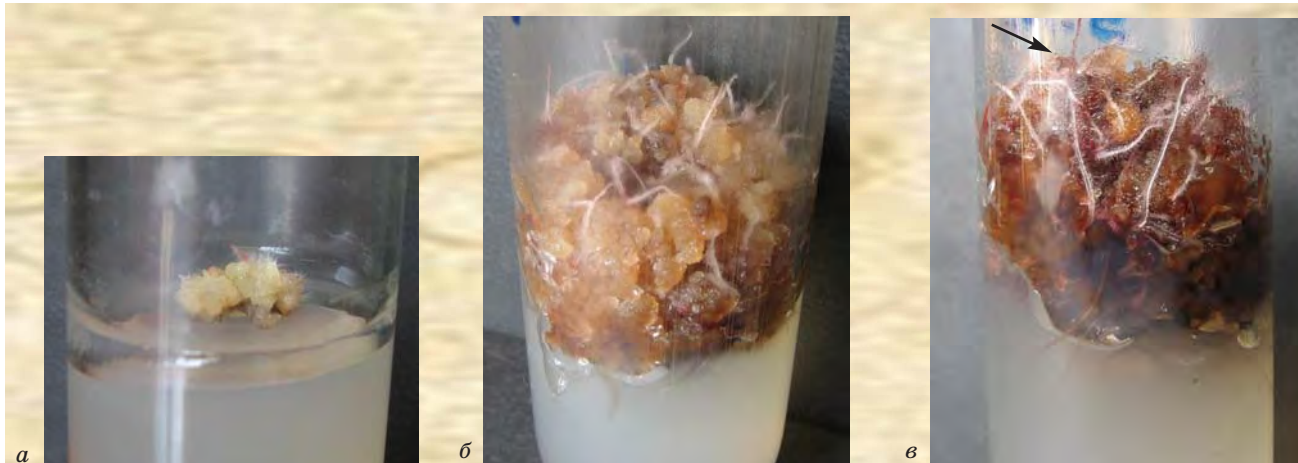


Рис. 1. Первинний калюс культури тканин синяка подорожничкового *Echium plantagineum*: а — перетворення насінневого корінця на калюс (живильне середовище 5C01); б — 3-й пасаж калюсу на живильному середовищі LS-м; в — 5-й пасаж: клітини калюсу починають синтезувати пігменти (стрілкою позначено червоний корінець)



Рис. 2. Селекція на підвищений вміст шиконінових пігментів калюсу культури *Echium plantagineum* L. на живильному середовищі LS-м: а, б, в — різні етапи селекції

Таблиця 1. Фенотипні відмінності варіантів калюсу *Echium plantagineum*, отриманих з різних насінин

Варіант калюсу <i>E. plantagineum</i>	Характеристика агрегатів тканини			
	Розмір	Структура	Забарвлення	Інтенсивність росту
2Ер 	До 2 см	Щільна	Поверхня частково червонобура, у розрізі — світло-жовта	Інтенсивний
3Ер 	До 3 мм	Середньої щільності	Яскраво-червоне	Інтенсивний
4Ер 	До 6 мм	Щільна	Буро-червоне	Повільний
5Ер	До 1 см	Середньої щільності	Червонобурувате	Середній
6Ер 	До 5 мм	Пухка	Світле	Інтенсивний

Таблиця 2. Вміст шиконінових ефірів, % від сухої маси

Пасаж №	Варіант калюсу <i>Echium plantagineum</i>				
	2Ер	3Ер	4Ер	5Ер	6Ер
5	Сліди	0,38±0,019	Сліди	Сліди	Сліди
13	0,36±0,018	0,94±0,047	0,39±0,019	0,95±0,047	Сліди
17	0,30±0,015	1,25±0,062	0,27±0,013	1,00±0,050	Сліди
19	0,29±0,014	1,24±0,062	0,85±0,042	0,52±0,026	Сліди
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

E. plantagineum у процесі її пасажування на живильному середовищі LS-м спостерігали мінливість кількісного і якісного складу ефірів шиконіну. Так, протягом перших пасажів одразу після перенесення калюсу з живильного середовища 5C01 на LS-м калюс формував багато червоноколірних корінців. Кірковий шар корінців синтезував шиконін та його похідні. Сам калюс також почав синтезувати шиконінові пігменти (рис. 3).

Однак якісний склад етанольних екстрактів калюсу і утворених корінців відрізнявся. На тонкошарових хроматограмах в екстрактах, виділених із корінців, спостерігали лише фракцію червоних пігментів, тимчасом як у калюсі поряд із червоними були також і сині пігменти (рис. 4). Такий умовний розподіл шиконінових ефірів було зроблено на основі кольору плям на тонкошаровій хроматограмі. Синтез клітинами первинного калюсу *E. plantagineum* синіх

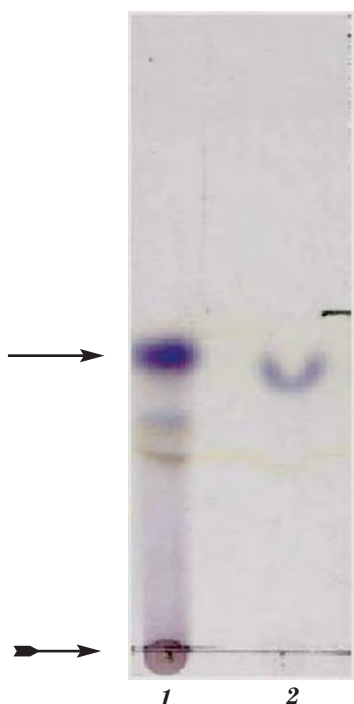


Рис. 3. Тонкошарова хроматографія складу шиконінових похідних у різних частинах первинного калюсу:

1 — етанольний екстракт калюсу *E. plantagineum*;
2 — етанольний екстракт корінців.

Стрілками позначено:

- ▀ червоні пігменти;
- ▄ сині пігменти

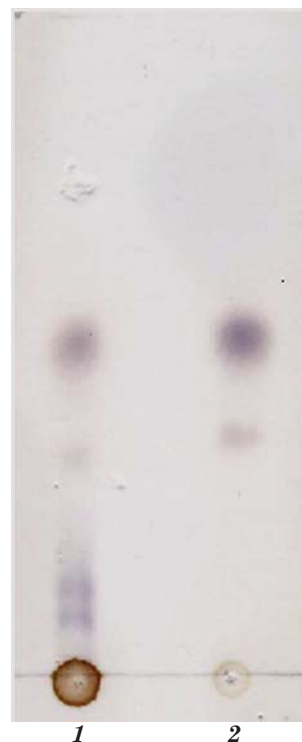


Рис. 4. Тонкошарова хроматографія етанольного екстракту калюсу культури *E. plantagineum*:

1 — етанольний екстракт;
2 — етанольний екстракт після проведення гідролізу 0,1 н. розчином КОН

пігментів, не характерних для культур — продуцентів червоних шиконінових пігментів, можна пояснити стресовими умовами, в яких перебувають клітини рослини під час калюсоутворення. При цьому змінюється реалізація генетичної інформації (активуються репресовані або сплячі гени, діють гени-модифікатори), припиняється синтез одних і починається утворення інших речовин вторинного синтезу. Проте з часом відбувається пристосування рослинних клітин (калюсу) до нових умов існування і може мати місце зворотний процес, коли нетипові для цієї рослини речовини, раніше чи пізніше, припиняють синтезуватись і в калюсі [12].

Після гідролізу етанольного екстракту біомаси синяка в 0,1 н. КОН з наступним хроматографічним аналізом методом тонкошарової хроматографії на силікагелі (див. розділ *Матеріали і методи*) було виявлено одну речовину червоного забарвлення (рис. 5). Методом спектрального аналізу в ультрафіолетовій та видимій частинах спектра було встановлено максимуми поглинання, а саме 275 нм, 490 нм, 520 нм

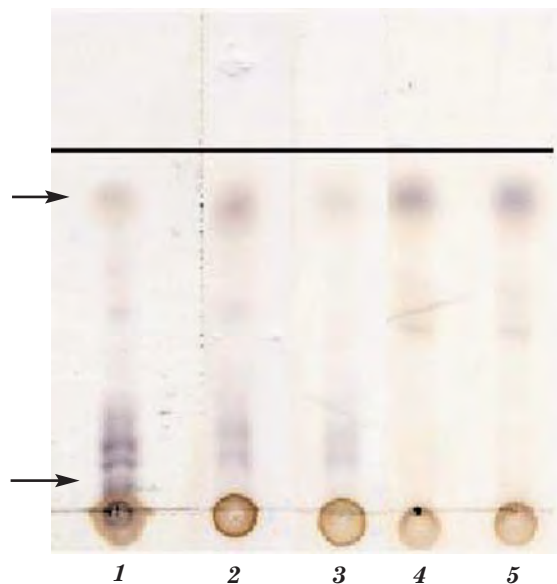


Рис. 5. Тонкошарова хроматографія етанольних екстрактів різних пасажів варіанту 3 Ер калюсної культури *E. plantagineum*:

1 — 3 Ер/7; 2 — 3 Ер/10;
3 — 3 Ер/13; 4 — 3 Ер/15;
5 — 3 Ер/17

і 556 нм, які відповідають шиконінам [13]. Тому нами зроблено висновок, що червоні та сині пігменти є похідними шиконіну.

У процесі подальшого пасажування і проведення селекції калюсів, спрямованої на відбір зразків, в яких ризогенез був відсутній, кількість синіх пігментів у етанольному екстракті калюсів знижувалась на фоні стабільного загального вмісту шиконінових похідних (рис. 6).

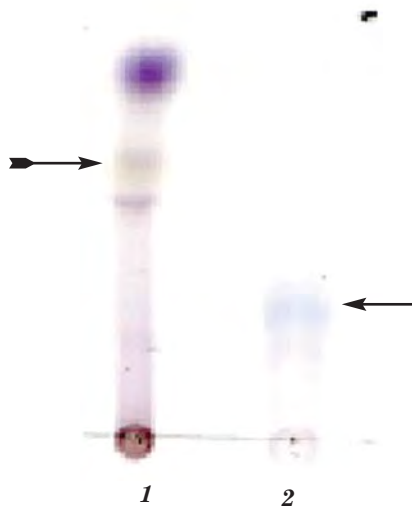


Рис. 6. Тонкошарова хроматографія одержаної фракції синіх пігментів:

1 — етанольний екстракт калюсу *E. plantagineum*;
2 — очищена фракція синіх пігментів.

Стрілками позначено:

- ➔ червоні пігменти;
- ➔ сині пігменти

Нами було виділено окремо фракцію синіх пігментів з етанольного екстракту методом титрування CuAc_2 , який з шиконінами утворює нерозчинний осад в органічних розчинниках [7], і подальшим хроматографуванням на колонці (Silica gel 60). Порівняння етанольного екстракту калюсу *E. plantagineum* та очищеної фракції синіх пігментів на тонкошаровій хроматограмі наведено на рис. 7.

Було підібрано також умови для розділення пігментів на колонці Silica gel 60 без попереднього осадження у вигляді нерозчинного комплексу (див. розділ *Матеріали і методи*). Попередній метод розділення є досить зручним і швидким, оскільки базується на двостадійній елюції, однак він, на відміну від останнього, не забезпечує розділення інших ефірів шиконіну.

Окрім шиконінових ефірів культура тканин синяка синтезувала два пігменти жовтого кольору, які було виділено методом ад-

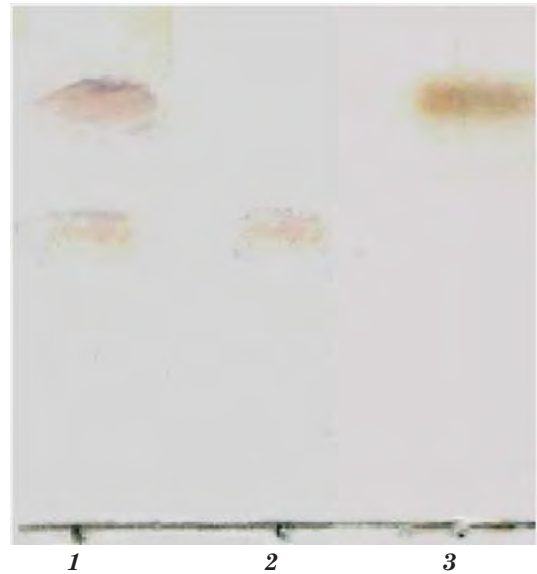


Рис. 7. Тонкошарова хроматографія бензехінофуранів калюсної культури тканин *E. plantagineum*:

1 — сумарний склад бензехінофуранів;
2, 3 — очищені методом адсорбційної хроматографії на силікагелі фракції бензехінофуранів

сорбційної хроматографії на колонці Silica gel 60 (рис. 4) і проаналізовано методом спектрального аналізу в ультрафіолетовій та видимій частинах спектра. Максимуми поглинання відповідають бензехінофуранам, а саме: 265 нм, 270 нм, 282 нм та 320 нм [13].

Порівняння якісного складу цих пігментів у різних варіантах калюсної культури на пізніших етапах культивування показало, що спектр барвників стає стабільним, тимчасом як кількість шиконінових пігментів може варіювати.

Таким чином, у культуру *in vitro* введено синяк подорожниковий *E. plantagineum* L. Первинні калюси отримали з корінців насінневих проростків на середовищі 5C01, створеному для рослинних культур тканин-суперпродуцентів. Одержані калюсні тканини адаптовано до середовища LS-м, розробленого для синтезу шиконінових похідних.

Визначено якісний склад пігментів, що синтезують клітини отриманих калюсів. З'ясовано, що на перших етапах становлення культури тканин *E. plantagineum* клітини разом із червоними синтезують сині пігменти, які також належать до похідних шиконіну. Однак через 1,5 року культивування в культурі виявлено тільки червоні пігменти. Це явище можна пояснити процесами адаптації клітин рослини *E. plantagineum* до

умов *in vitro*. Спостерігали також утворення невеликої кількості жовтих пігментів із класу бензехінофуранів. На пізніх стадіях становлення різні варіанти калюсу мали відмінності тільки в кількості червоних пігментів, якісний склад був подібним.

Методом добору дрібних клітинних агрегатів проведено початкову селекцію на підвищену продуктивність за похідними шиконіну. Відібрано найбільш перспективний за показниками продуктивності варіант культури тканин (клітинна лінія *E. plantagineum* ЗЕр).

Відселектована клітинна лінія синяка ЗЕр накопичує 2,11% похідних шиконіну у

сухій масі, маючи приріст біомаси 16 г/л за тривалості пасажу 14 діб. Цей варіант калюсу використано нами в подальшому для вирощування синяка у вигляді суспензійної культури, що є проміжним етапом у створенні біотехнології одержання червоних нафтохінонових пігментів.

Особлива подяка співробітникам відділу квітникарства Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України С. Машковській та Р. Іванікову за надане для роботи насіння синяка подорожникового *E. plantagineum* L.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доброчаева Д. Н. Бурачничкоцветные (*Boraginales* Hutch.) Европейской части СССР: Дис. ... докт. биол. наук: 03.00.12 — К., 1977. — С. 269–290.
2. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Caprifoliaceae* — *Plantaginaceae* / Под ред. П. Д. Соколова. — Л.: Наука, 1990. — С. 109–133.
3. Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Coula-douros E. A. et al. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 1999. — V. 38. — P. 270–300.
4. Pietrosiuk A., Syklovska-Baranek K., Wiedenfeld H. et al. The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. // *Plant Cell Rep.* — 2006. — V. 25. — P. 1052–1058.
5. Барабой В. А. Растительные фенолы и здоровье человека. — М.: Наука, 1984. — 160 с.
6. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Потанчук Е. А. и др. Получение культуры тканей *Ungernia Victoris* и её особенности при выращивании на питательных средах различного состава // *Биотехнология.* — 2007. — № 1. — С. 14–21.
7. Давыденков В. Н., Патудин А. В., Попов Ю. Г. и др. Культура клеток *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst — новый источник получения шиконина // *Хим.-фарм. журн.* — 1991. — № 1. — С. 53–55.
8. 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.* — V. 41. — Berlin; Heidelberg: Springer-Verl., 1998. — P. 28–44.
9. Федорев С. А., Денисенко В. А., Булгаков В. П. Исследование химического состава хиноидных пигментов из клеточной культуры ВК-39 *Lithospermum erythrorhizon* // *Хим.-фарм. журн.* — 1993. — №1. — С. 33–37.
10. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. — М.: Финансы и статистика, 1982. — 344 с.
11. Голубенко А. В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.: 03.00.12. — К., 2005. — С. 17.
12. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
13. Bang Y. H., Jai S. R. Monoamine Oxidase Inhibitory Naphthoquinones from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* // *Arch. Pharm. Res.* — 2005. — V. 28, N 4. — P. 400–404.

**ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ
СИНЯКА ПОДОРОЖНИКОВОГО
(*Echium plantagineum* L.) —
ПРОДУЦЕНТА ШИКОНИНОВЫХ
ПИГМЕНТОВ**

*О. А. Поронник
В. А. Шаблій
В. А. Кунах*

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: oksana_poronnik@ukr.net

Получена культура тканей *E. plantagineum* из корешков семенных проростков на агаризованной питательной среде 5C01. Культивирование на питательной среде LS-м инициировало биосинтез красных шикониновых пигментов. Отселектирован вариант каллюсной культуры (3Ep), накапливающий 2,11% производных шиконина от сухой биомассы, выход которой на 14-е сутки роста составляет 16 г/л питательной среды. Методами тонкослойной хроматографии (на пластинках Sorbfill УФ 254) и хроматографии на колонке (Silica gel 60) исследован спектр шикониновых производных в процессе становления культуры. Установлено, что органогенная культура на первых этапах культивирования на питательной среде LS-м наряду с красными фракциями шикониновых пигментов синтезировала и синие. Однако через 1,5 года культивирования клетки каллуса синяка синтезировали только красные фракции шикониновых пигментов.

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

**GENERATION OF *Echium plantagineum* L.
TISSUE CULTURE
WHICH IS PRODUCENT
OF SHIKONIN PIGMENTS**

*O. O. Poronnik
V. A. Shablij
V. A. Kunakh*

Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: oksana_poronnik@ukr.net

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 2.11% of shikonin derivatives per dry biomass whose yield on the 14th day of growth constituted up to 16 mg/L of nutrient medium was selected. Through the thin layer chromatography (in Sorbfill UV 254 plates) and column chromatography (Silica gel 60) there was evaluated the spectrum of shikonin derivatives in the course of culture establishment. Organogenic culture at the first steps of culturing on the LS-m nutrient medium was found to synthesize alongside with red fractions of shikonin pigmentes the blue ones as well. But after 1,5 year of cultivation *Echium* callus cells synthesized exclusively red fractions of shikonin pigments.

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