

ЖУК В.П.^{1✉}, САХНО Л.О.¹, ХАРХОТА М.А.², ІСАЄНКОВ С.В.¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: viktor.zhuk@gmail.com

² Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 154
✉ viktor.zhuk@gmail.com, (098) 881-11-19

ЖИРНО-КИСЛОТНИЙ СКЛАД КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР З РІЗНИХ ТИПІВ ЕКСПЛАНТІВ РОСЛИН АМАРАНТУ

Амарант, або щириця (лат. *Amaranthus*), широко поширений рід переважно однорічних трав'янистих рослин. У багатьох країнах світу амарант використовується як овоч, круп'яна культура, лікарський засіб і кормова рослина. Амарант є важливою поживною культурою тому, що не вимагає особливих умов вирощування, має підвищену поживну цінність і високий рівень врожайності [1, 2]. Листя *A. tricolor* містить вітамін А і аскорбінову кислоту (вітамін С) [3]. Амарант має більше рибофлавіну (В2) і вітаміну С, ніж зернові культури, та також є гарним джерелом вітаміну Е і К. В *Amaranthus* є велика кількість необхідних мінералів. Наприклад, листя рослин містять калій, кальцій, магній, цинк, залізо, марганець і нікель [3]. Особливу цінність мають зерна амаранту тому, що містять 20–23 % білка з підвищеним співвідношенням лізину, поліненасичених жирних кислот, крохмалю, стеролів і флавоноїдів [1, 4–6]. Введення рослин у культуру *in vitro*, зокрема амаранту, та підбір умов ефективного калюсоутворення за допомогою програмування режиму культивування відкриває нові горизонти щодо створення нових біологічних систем для продукції біологічно активних сполук та інших важливих речовин для потреб харчової промисловості та фармакології. Вивчення регулювання біосинтезу важливих біологічних сполук в культурі *in vitro* з суттєво відмінним хімічним складом, відібраних шляхом композиційного скринінгу та відбором перспективних клітинних культур-донорів, має велике значення.

Важливими компонентами метаболізму рослин є жирні кислоти, що мають надзвичайно важливе значення для харчових та дієтологічних потреб людини, технологій виробництва біопалива та косметики. Незамінні жирні кислоти важливі для серцево-судинної системи: перешкоджають розвитку атеросклерозу, покращують кровообіг, мають кардіопротекторну і

антиаритмічну дію [7, 8]. Поліненасичені жирні кислоти зменшують запальні процеси в організмі, покращують живлення тканин. Омега-3 знижують концентрацію жиру в крові, підвищений артеріальний тиск, зменшують згортання крові при атеросклерозі, зменшують запалення [9–12]. Омега-6-жирних кислот багато в кукурудзяній і соняшниковій олії. Відомо, що вони знижують вміст у крові холестерину. Представником омега-9-жирних кислот є олеїнова кислота, що впливає на обмін холестерину і на стан жовчних шляхів, за даними експертів ВООЗ, знижує ризик серцево-судинних захворювань [13]. Вивчення складу та особливостей накопичення цих сполук в різних органах та культурах має велике значення для подальшого розвитку біотехнологій з видобутку цих корисних сполук для потреб індустрії.

Матеріали і методи

У роботі використовували два сорти амаранту: Геліос і Глевахівський. Насіння двох сортів стерилізували спочатку в 70 %-му етиловому спирті, а потім у гіпохлориті та промивали дистильованою водою. Стерильне насіння пророщували на безгормональному живильному середовищі. Отримані рослини мікроклонально розмножували в стерильних умовах та висаджували у пробірки на середовище, що містило солі і вітаміни Гамборга, а також 2 % цукрозу, 8 % агар, рН 5,7. Для отримання калюсу використовували гіпокотилі, сім'ядольні листки, листові диски і міжвузля пагонів розміром 5–7 мм віком від 4 до 6 тижнів. Експланти переносилися на середовища з різними концентраціями фітогормонів (рис. 1). Калюс культивували протягом 6 тижнів, ефективність кожного середовища оцінювали за здатністю індукувати калюсоутворення на експлантатах, а саме появи калюсних колоній більше, ніж 1–2 мм та морфології отри-

маних калюсів. Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою та щільністю.

Жирні кислоти виділяли з проб калюсних культур різних типів експлантів (гіпокотилі, сім'ядольні листки, міжвузля пагонів та листові диски). Для порівняння також були взяті зразки тих самих рослин, як за контролю. Для приготування екстрактів брали 100 мг рослинного матеріалу. Рослинну тканину подрібнювали скальпелем у чашці Петрі. Переносили рослинний матеріал до скляних пробірок із кришками, що закручуються і мають тефлонові прокладки, і додавали 3,3 МП реакційної суміші, яка мала в своєму складі метанол:толуол: H_2SO_4 в об'ємному співвідношенні 44:20:2. Потім вносили до пробірок 1,7 МП гексану. Гептадеканову кислоту (С 17:0) використовували як внутрішній стандарт. Пробірки витримували на водяній бані за 80°C протягом 2 год. На початку прогрівання пробірки м'яко струшували для утворення однофазної рідини з попередньо двофазної. При охолодженні за кімнатної температури знов відбувалося утворення двофазної системи. Верхню фазу, в якій концентрувалися метилові ефіри жирних кислот, відбирали і використовували для аналізу. Аналіз проводили в газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert з капілярною колонкою DB-FFAP (довжина – 30 м; внутрішній діаметр – 0,25 мм; товщина покриття 0,25 мкм) (J&W Scientific). Реакція відбувалася за температурної програми від 150°C до 220°C з градієнтом 2°/хв; як газ-носії використовували гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Температура інжектора дорівнювала 250°C. Для ідентифікації отриманих спектрів жирних кислот використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 02 і стандартну суміш метилових ефірів жирних кислот бактерій Supelco.

Результати та обговорення

На першому етапі нами були проведені експерименти з вивчення потенціалу утворення калюсної маси у різних типів експлантів рослин амаранту. Для ефективного ініціювання первинного калюсу на експлантах були протестовані середовища доповнені різними гормонами в різних комбінаціях. Виходячи з літературних джерел, у роботі використовували 2,4-Д, БАП, кінетин та НОК в різних концентраціях та в комбінації між собою (табл.). Калюс витримували на підібраних поживних середовищах протягом 6 тижнів. Ініціювання калюсу спостерігалось на зрізаних кінцях експлантів після 10 днів культивування на середовище. Частота індукції калюсу була досить різноманітна між тестованими комбінаціями фітогормонів. Було встановлено, що найбільш оптимальним поживним середовищем для індукції структурованого та щільного калюсу виявилось те, що містило 2,4-Д у концентрації 0,5 мг/л, 1 мг/л НОК і 0,5 мг/л кінетину відповідно (рис. 1). За таких умов через чотири тижні спостерігали інтенсивне утворення добре розвинутого калюсу яскравого кольору та щільної структури. Експлантати, культивовані на середовищі Гамбурга з НОК і БАП, показали трохи нижчий відсоток індукції калюсу. У всіх протестованих комбінаціях фітогормону на середовище з НОК і БАП спостерігалось утворення пухкого, зеленуватого калюсу, який швидко поширювався через 3 тижні, проте далі спостерігався некроз культури після 5-го пасажу. Відповідно до експериментальних даних було відмічено, що для ефективно проліферації калюсу обраних експлантів потрібне середовище, яке містить 2,4-Д в концентрації 0,5 мг/л у поєднанні з 1 мг/л НОК та 0,5 мг/л кінетину. Наші результати показують, що здатність формувати калюс притаманна усім видам експлантів та майже на всіх досліджуваних середовищах.

Таблиця. Концентрації регуляторів росту для калюсоутворення

№ середовища	Комбінації регуляторів росту у середовищі Гамборга
1	0,5мг/л 2,4-Д; 1 мг/л НОК; 0,5 мг/л кінетину
2	1,5 мг/л БАП; 0,25 мг/л НОК
3	1 мг/л БАП; 0,2 мг/л НОК
4	2 мг/л БАП; 0,1 мг/л НОК
5	0,5 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кінетину

Визначення методом газової хроматографії масової частки метилових ефірів жирних кислот засновано на перетворенні тригліцеридів жирних кислот у їх метилові ефіри і подальшому газохроматографічному аналізі останніх. Вивчаючи можливість отримання жирних кислот методом культури тканин були проаналізовані калюсні культури, індуковані з експлантів гіпокотилів, сім'ядольних листків, міжвузлів пагонів та листових дисків.

У досліджуваних жирових композиціях у калюсній культурі амаранту ідентифікована значна кількість одноосновних насичених карбонових кислот (рис. 2). Зразок жирової суміші калюсної культури амаранту сорту Глевахівський з експлантів міжвузлів пагонів відрізняється високим вмістом пентадеканової кислоти (31,026 %). Пентадеканову кислоту використовують як біологічний маркер в оцінці метаболічних факторів ризику при прийомі молочного

жиру [14]. Калюсна культура з експлантів гіпокотилів рослин амаранту сорту Геліос відрізняється високим вмістом маргаринової кислоти (19,06 %) (рис. 2). Більш низький вміст цієї кислоти притаманний для усіх типів калюсних культур, окрім культури з експлантів міжвузлів пагонів сорту Глевахівський.

Маргаринова кислота є важливою сировиною для виробництва косметичних засобів та часто вводиться у склад масел і жирів. Важливу функцію має пальмітинова кислота – це основна насичена жирна кислота, що міститься в грудному молоці. У досліджуваних нами зразках найбільший вміст цієї кислоти було виявлено також в експлантів гіпокотилів (7,138 %) і міжвузлів пагонів (5,318 %) сорту Геліос ніж у калюсних культурах сорту Глевахівський. Незначний відсоток арахідонової кислоти (2,327 %) було виявлено в калюсній культурі рослин амаранту сорту Глевахівський.

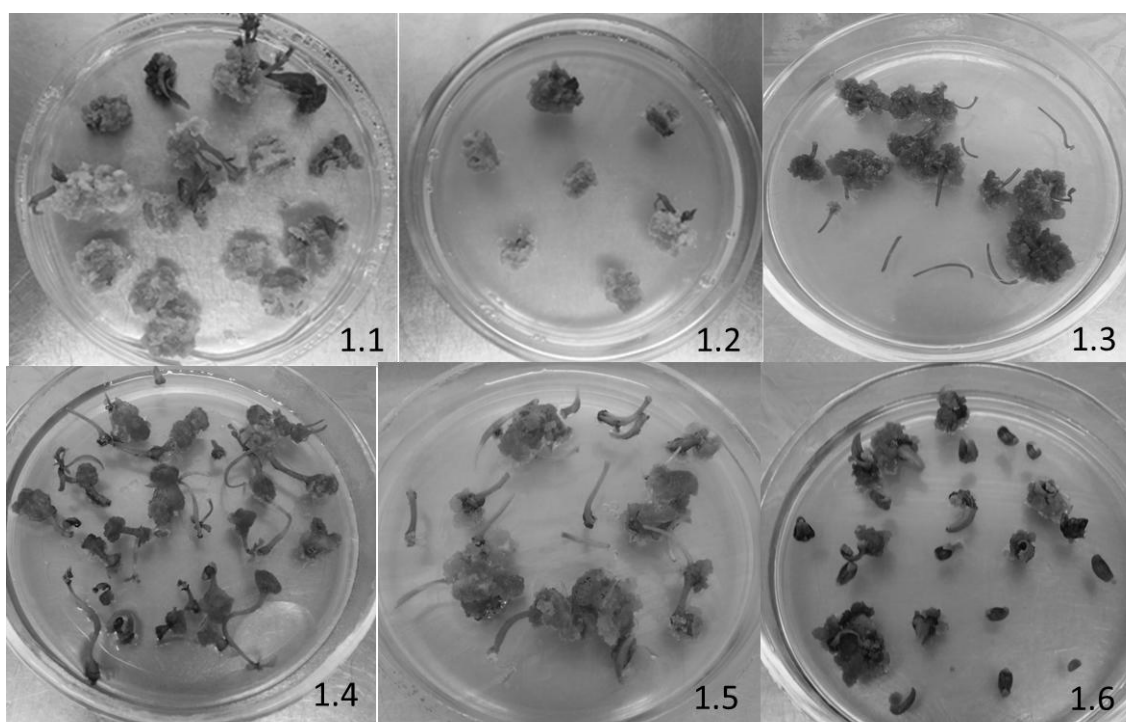


Рис. 1. Індуція калюсогенезу з різних експлантів рослин амаранту сортів Глевахівський (1.1, 1.2, 1.3) * та Геліос (1.4, 1.5, 1.6). ***1.1 – листові диски; 1.2 – міжвузля пагонів; 1.3 – гіпокотилі; **1.4 – міжвузля пагонів; 1.5 – гіпокотилі; 1.6 – сім'ядольні листки. Масштаб: 9 см; 9 см; 9 см; 9 см; 9 см; 9 см.

Відповідно до результатів нашого аналізу для обох сортів амаранту в склад жирних кислот входять лінолева, олеїнова, 11-ейкозенова та пальмітинова кислоти. Поліненасичена ейкозенова кислота, що належить до ω -3, у досліджуваних зразках міститься в кількості від 4,562 до 2,308 % від суми жирних кислот. Отже, можна зробити висновок, що калюсна культура з експлантів міжвузлів пагонів та з експлантів гіпокотилів сорту Геліос містила найбільший відсоток ω -3 поліненасичених жирних кислот у порівнянні з калюсами інших сортів та типів експлантів. Калюсні культури з листових дисків сорту Глевахівський містили лише 0,641 % ейкозенової кислоти. Усі інші зразки показали відсутність цієї речовини у своєму складі жирних кислот. Лінолева кислота відноситься до так

званих ω -6 незамінних жирних кислот, необхідних для нормальної життєдіяльності організму. У людини вона засвоюється з тригліцеридів. У вигляді тригліцеридів лінолева кислота в значних кількостях входить до складу багатьох рослинних олій та тваринних жирів, наприклад, соєвої, бавовняної, соняшникової, лляної, конопляної олій, китового жиру. Найбільшим вмістом олії відрізнялися калюсні культури рослин амаранту сорту Геліос з експлантів гіпокотилю 7,169 %. У калюсній культурі листових дисків і міжвузлів пагонів рослин амаранту сорту Глевахівський ідентифіковано до 6,792 % і 3,599 % відповідно. Найнижчий вміст Омега-6 мала калюсна культура з експлантів сім'ядольних листків – 1,308 % (рис. 3).

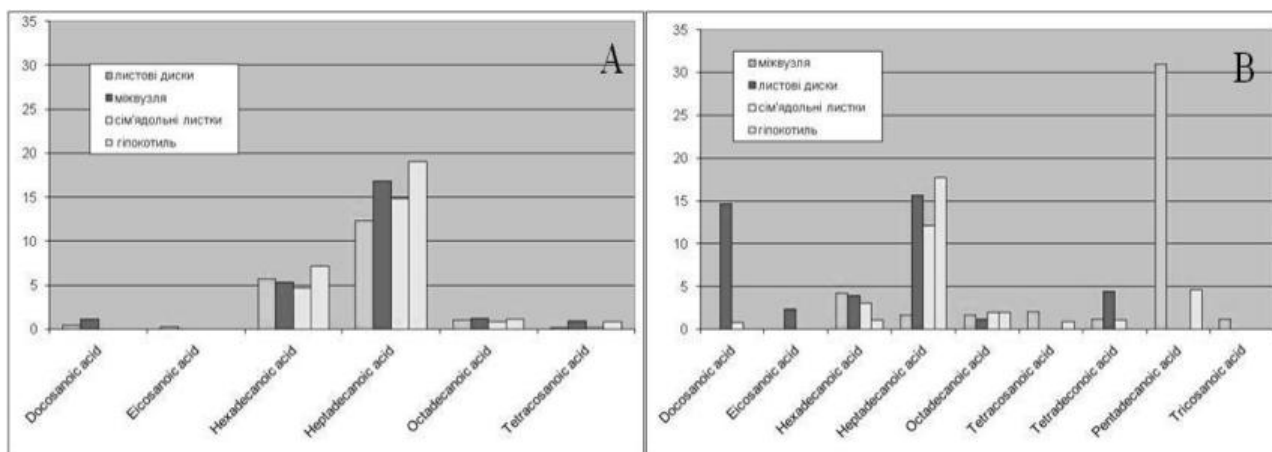


Рис. 2. Склад (%) однонасичених жирних кислот у калюсних культурах амаранту сорту Геліос (А) та Глевахівський (В).

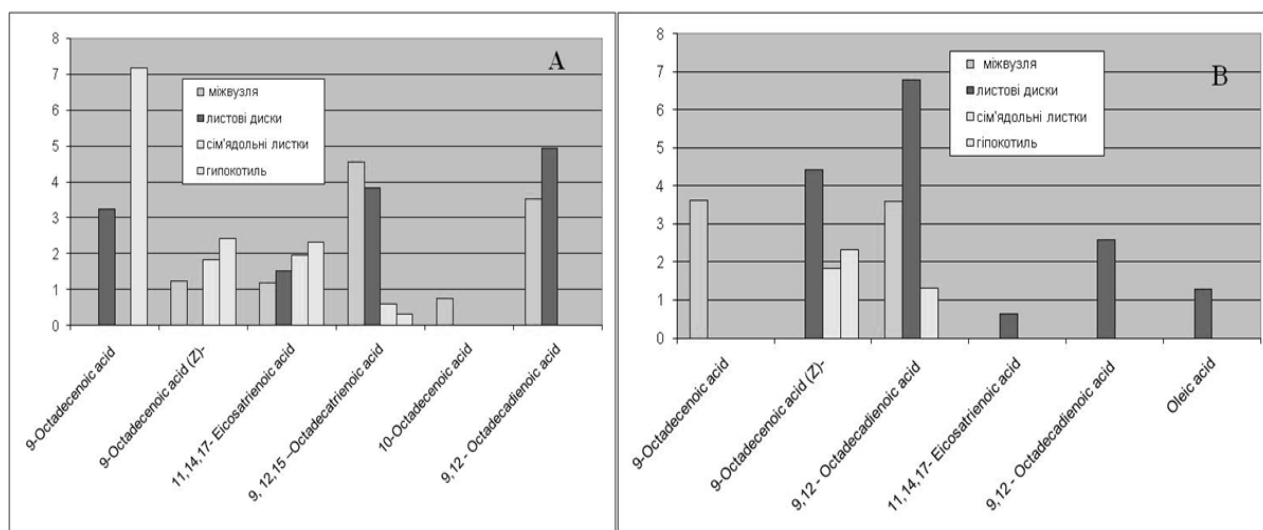


Рис. 3. Вміст (%) жирних кислот у калюсних культурах амаранту сорту Геліос (А) та Глевахівський (В).

Найбільший вміст олеїнової кислоти був властивий калюсним культурам сорту Глевахівський. Калюси з усіх чотирьох типів експлантів мали такий вміст: листові диски 4,434 %; міжвузля пагонів 3,624 %; гіпокотилі 2,333 %; сім'ядольних листків 1,822 %. Культура сорту Геліос відрізнялася дещо нижчими показниками для цієї кислоти (гіпокотилі 2,415 %; міжвузля пагонів 1,239 %). Високий вміст олеїнової кислоти характерний для оливкової олії. Слід зазначити, що утворення вторинних метаболітів у культурі рослин може збільшуватися під впливом деяких стресових факторів (продуктів життєдіяльності певних мікроорганізмів, іонів важких металів, осмотичного шоку тощо). Отже, подальший напрямок досліджень буде спрямовано на оцінку ролі деяких типів елісаторів, на синтез та накопичення біологічно-активних речовин у відібраних калюсах та інших варіантах культур *in vitro*.

Висновки

Підібрані умови отримання калюсної маси для рослин *Amaranthus*. Експланти листових

дисків і міжвузля пагонів виявляли однакову інтенсивність калюсоутворення. Було відмічено, що для ефективної проліферації калюсу обраних експлантів потрібне середовище, яке містить 2,4-Д в концентрації 0,5 мг/л у поєднанні з 1 мг/л НОК та 0,5 мг/л кінетину. Було показано, що калюсна культури амаранту з експлантів міжвузлів пагонів (4,562 %) та з експлантів гіпокотилів (2,308 %) сорту Геліос містить найбільший відсоток Omega-3 поліненасичених жирних кислот у порівнянні з іншими типами калюсів. У культурах *in vitro* з листових дисків та міжвузлів пагонів сорту Глевахівський міститься до 6,792 % і 3,59 % стеаринової кислоти. Найвищий вміст Omega-9 мали калюсні культури з сорту Глевахівський, а саме калюс із листових дисків 4,434 %; з міжвузля пагонів 3,624 %; з гіпокотилів 2,33 %; з сім'ядольних листків 1,822 %. Склад жирних кислот у калюсних культурах різних типів експлантів відрізнявся для всіх типів тестованих калюсних культур із різних видів експлантів. Різниця у композиції та вмісті різних жирних кислот залежить не тільки від типу експлантат, а й від сорту рослини.

Література

1. Rastogi A., Shukla S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values Critical Review // Food Science and Nutrition. – 2013. – V. 53. – P. 109–125.
2. Chong M.F., Lockyer S., Saunders C.J., Lovegrove J.A. Long chain n-3 PUFA-rich meal reduced postprandial measures of arterial stiffness // Clin. Nutr. – 2010. – V. 29. – P. 678–681.
3. Shukla S. Mineral Profile and Variability in Vegetable Amaranth (*Amaranthus tricolor*) // Plant Foods for Human Nutrition. – 2006. – V. 61 (1). – P. 23–28.
4. Gupta S., Prakash J. Studies on Indian green leafy vegetables for their antioxidant activity // Plant Foods for Human Nutrition. – 2009. – V. 64. – P. 39–45.
5. Murugan S.B., Deepika R., Reshma A., Ashwini M., Sathishkumar R. Assessment of free radical scavenging activities of leaves and stem fractions of green leafy vegetables. Afr. J. Pharm. Pharmacol. – 2014. – V. 8. – P. 1138–1145.
6. Murugan S.B., Deepika R., Reshma A., Balamurugan S., Sathishkumar R. Antioxidant capacities of *Amaranthus tristis* and *Alternanthera sessilis*: A comparative study. // J. Med. Plants. Res. – 2013. – V. 7. – P. 2230–2235.
7. Carrero J.J., Baro L., Fonolla J., González-Santiago M., Martínez-Férez A., Castillo R., Jiménez J., Boza J.J., López-Huertas E. Cardiovascular effects of milk enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid folic acid and vitamins E, B6 and B12 in volunteers with mild hyperlipidaemia // Nutr. – 2004. – V. 20. – P. 521–527.
8. Toader M., Roman G.V. Experimental results regarding morphological, biological and yield quality of *Amaranthus hypocondriacus* L. Species under the Central part of Romanian Plain conditions // Research J. of Agric. Science. nr. – 2009. – V. 41 (1). – P. 54–57.
9. Finnegan Y.E., Minihane A.M., Leigh-Firbank E.C., Kew S., Meijer G.W., Muggli R., Calder P.C., Williams C.M. Plant- and marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids have differential effects on fasting and postprandial blood lipid concentrations and on the susceptibility of LDL to oxidative modification in moderately hyperlipidemic subjects // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – V. 77. – P. 783–795.
10. Milte C.M., Coates A.M., Buckley J.D., Hill A.M., Howe P.R. Dose dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fish oil on erythrocyte docosahexaenoic acid and blood lipid levels // Br. J. Nutr. – 2008. – V. 99. – P. 1083–1088.
11. Pawlosky R.J., Hibbeln J.R., Novotny J.A., Salem N.Jr. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans // J. Lipid. Res. – 2001. – V. 42. – P. 1257–1265.
12. Taylor C.G., Noto A.D., Stringer D.M., Froese S., Malcolmson L. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes // J. Am. Coll. Nutr. – 2010. – V. 29. – P. 72–80.

13. Teres S., Barcelo-Coblijn G., Benet M., Alvarez R., Bressani R., Halver J.E., Escriba P.V. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil // *Proceedings of the Nation. Academy of Scien.* – 2008. – V. 105 (37). – P. 13811–13816.
14. Smedman A.E.M., Gustafsson I.B., Berglund L.G.T., Vessby B.O. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: Relations between intake of milk fat and metabolic risk factors // *Americ. J. of Clinic. Nutr.* – 1999. – V. 69 (1). – P. 22–29.

ZHUK V.P.¹, SAKHNO L.O.¹, HARHOTA M.A.², ISAYENKOV S.V.¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv-143, Osipovskogo str., 2a, e-mail: viktoria.zhuk@gmail.com*

² *D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 154*

THE FATTY ACIDS CONTENT OF CALLI CULTURES FROM DIFFERENT EXPLANT TYPES OF AMARANTUS PLANTS

Aim. The aim of our study was selection of optimal conditions for the initiation of *Amaranthus* L. aseptic callus *in vitro* culture from different types of explants and estimation of fatty acid composition in these types of cell cultures. **Methods.** *In vitro* culture using leaf disks and internodes as explants. Inert gas chromatography **Results.** The optimized Gamborg medium for callus induction was designed (sucrose 25 g/1L; 2,4-D 0.5 mg/L; NAA 1 mg/L). The kinetin in concentration 0.5 mg/L for internodes and for leaf discs explants were added. The fatty acid profiles of calli cultures from the different types of plant explants were analyzed The highest level of Omega-3 fatty acid were detected in cell cultures from internodes and leaf discs of cultivar Helios. **Conclusions.** Our optimized protocol for *Amaranthus* callus initiation could be used for further studies of the synthesis and accumulation of biologically active metabolites in *Amaranthus* tissue culture. The fatty acid composition of calli cultures depend from explant type as well as from plant cultivar.

Keywords: *Amaranthus*, callus, *in vitro* culture, fatty acid composition.