

## СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА *SILYBUM MARIANUM* КРАСНО- И БЕЛОЦВЕТКОВОЙ РАС: ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ

КОВЗУНОВА Ольга Викторовна, научный сотрудник  
отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад  
Национальной академии наук Беларуси»

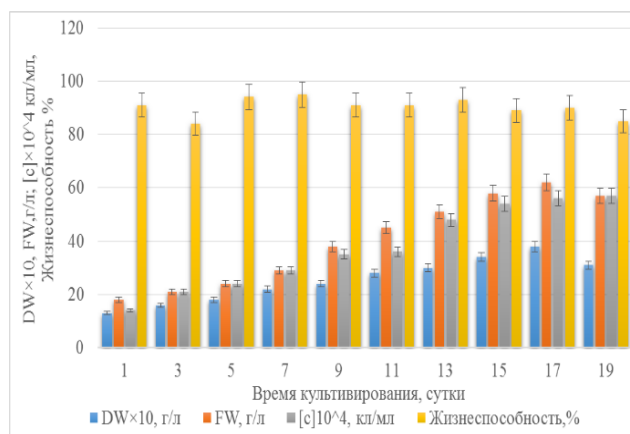
Лекарственные растения являются природными источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. В настоящее время они широко применяются как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической промышленности. Альтернативными источниками получения биологически ценных веществ растительного происхождения могут стать культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Биотехнологические подходы позволяют получать продукт независимо от внешних климатических, почвенных условий, круглогодично и сохраняя при этом естественные ареалы ценных лекарственных растений [1,2]. Расторопша пятнистая характеризуется уникальным комплексом флавонолигнанов, обуславливающим антигепатотоксическое, гепатопротекторное и антихолестерологическое действия [3].

Цель нашего исследования состояла в получении суспензионной культуры *S.marianum* красно- и белоцветковых рас и анализе ее ростовых характеристик.

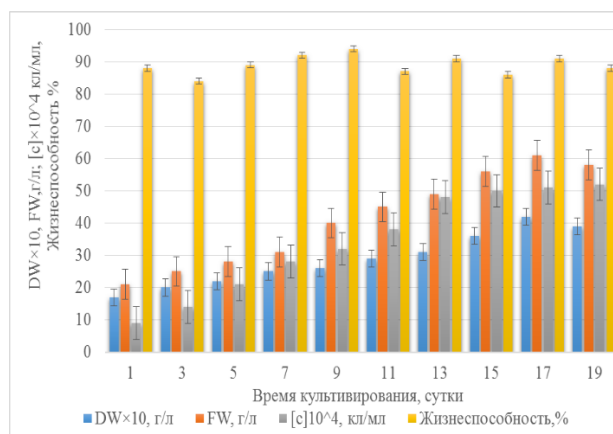
Суспензионную культуру расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортаобразца Sibilla получали из кусочков рыхлого корневого и стеблевого каллуса 3 пассажа красно- и белоцветковой рас расторопши (массой не более 1,5 г), далее помещали в круглодонные колбы объемом 100 мл, содержащие жидкую среду Мурасиге-Скуга, дополненную гормонами 2 мг/л бензиламинопурина и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Колбы ставили в люминостат при 24-25°C на круговой качалке (100-120 об/мин). Спустя 16 дней культуру ресуспендировали и удаляли крупные кусочки исходного каллуса и агрегаты клеток (фильтрованием). Пассирование проводили с интервалом 16-18 дней на свежую питательную среду.

Анализ ростовых характеристик культур клеток *S.marianum* красно- и белоцветковых рас определяли по общепринятым методикам [4]. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Кроме того, были рассчитаны индекс роста, удельная скорость роста и продуктивность по биомассе.

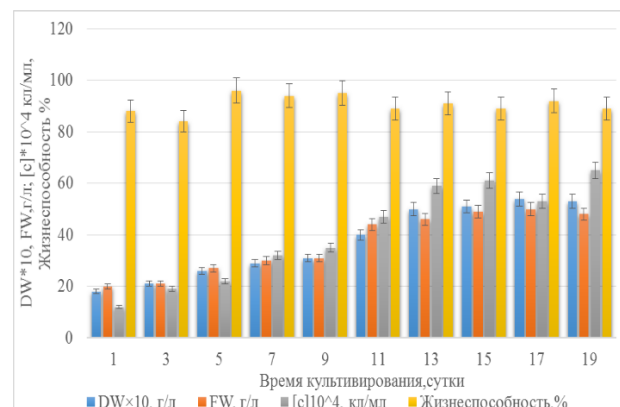
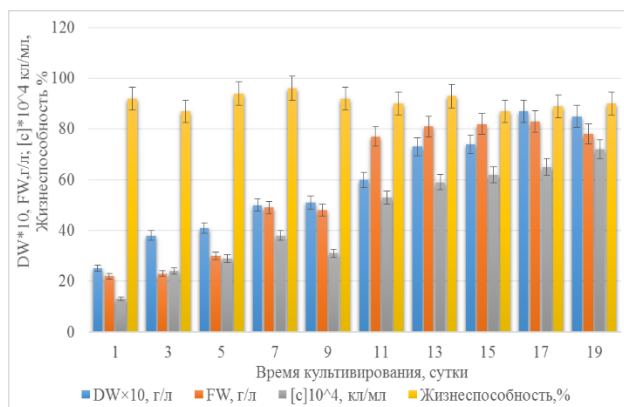
Как следует из представленных результатов, жизнеспособность клеток варьировала от 92 до 96 % у стеблевой культуры и от 88 до 95 % у корневой культуры белоцветкового сортаобразца и несколько снижалась к концу культивирования (до 90 и 89 %, соответственно). Для исследуемых линий суспензионной культуры в период 9-11-х суток отмечен эффект «ступеньки». Вероятно, данный эффект связан с особенностью утилизации сахарозы — расщеплением в среде с дальнейшим последовательным потреблением фруктозы, либо же с наличием двух субполярных клеток в культуре. Аналогичные эффекты были описаны для культур клеток женьшеня и трансгенных линий табака [5].



А



Б



В

Г

А, В – стеблевая культура, Б, Г – корневая культура, DW– масса сухих клеток, г/л; FW – масса сырых клеток, г/л; с – число клеток

**Рисунок 1 — Динамика изменения ростовых характеристик и уровня жизнеспособности суспензионной культуры *S. marianum* красноцветкового сорта Золушка (А, Б) и белоцветкового сортаобразца Sibilla (В, Г)**

У красноцветкового сорта Золушка жизнеспособность клеток стеблевой и корневой культуры сохранялась на уровне от 84 до 95 % и от 84 до 94 %, соответственно. Наибольшая жизнеспособность клеток приходится на экспоненциальную фазу роста как у красно-, так и белоцветковой рас расторопши.

Было установлено, что ростовой цикл полученной культуры составляет 14-19 суток. Через 17 суток после начала инкубирования наблюдается прекращение прироста сухой массы.

У расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас латентная фаза длилась четверо суток. Затем наступала экспоненциальная фаза роста, где клетки активно делились. После экспоненциальной фазы роста, которая длилась около 7 суток, клетки вступали в фазу линейного роста и далее в стационарную фазу. На 17-е сутки начинается фаза деградации клеток. За период субкультивирования число клеток увеличилось в 4 раза в стеблевой и в 5,7 раз в корневой суспензионной культурах красноцветкового сорта Золушка и в 5,5 раз у стеблевой и 5,4 раз корневой суспензионной культур белоцветкового сортаобразца Sibilla.

Исследуемые суспензионные культуры имеют удовлетворительные ростовые характеристики, из особенностей которых можно отметить отсутствие значительных различий удельной скорости роста, что может свидетельствовать о сбалансированности роста культуры. Однако стоит отметить, что максимальное значение удельной скорости роста приходится на стеблевую культуру белоцветкового сортаобразца Sibilla. Время удвоения также не выявило значительных различий, за исключением стеблевой суспензионной культуры красноцветкового сорта Золушка, у которой оно было максимальным через 6 часов после начала культивирования. Был также рассчитан такой показатель, как продуктивность и экономический коэффициент. В целом, суспензионные культуры белоцветкового сортаобразца дают более высокие показатели, в особенности стеблевая культура, где продуктивность и экономический коэффициент составили 6,1 г/л и 3,98 г/г сахарозы, соответственно. Для суспензионных культур расторопши красноцветкового сорта также характерны достаточно высокие уровни продуктивности, удельной скорости роста и максимального накопления биомассы, с максимумом у корневой и стеблевой суспензионной культуры, соответственно: 5,783 г/л, 2,733 сут<sup>-1</sup>, 109,88 г/л, и 4,437 г/л, 2,095 сут<sup>-1</sup> и 84,32 г/л.

Эти данные позволяют нам выделить стеблевую суспензионную культуру белоцветковой рас расторопши Sibilla, как наиболее перспективную культуру для использования в биореакторах с целью получения биологически активных веществ.

#### Список использованных источников

1. Rao, S. R. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites / S. R. Rao, G. A. Ravishankar // Biotechnol. Advances. – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 101-153.
2. Karuppusamy, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // J. Of Med. Plants Res. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222-1239.

3. Pradhan, S. C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine / S. C. Pradhan, C. Girish // *Ind. J. of Med. Res.* – 2006. – Vol. 124, № 5. – P. 491-504.

3. Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук; АН УССР, Ин-т физиологии растений. – Киев: Навук. думка, 1980. – 488 с.

4. Рост и биосинтетические характеристики суспензионной культуры *Taxus baccata* при выращивании в колбах и биореакторе / Л. В. Орлова [и др.] // *Вестн. Поволж. гос. технол. ун-та. Сер.: Лес. Экология. Природопользование.* – 2014. – № 3 (23). – С. 86-97.