

Из всех вариантов обработки наилучшие результаты были получены в варианте с «Натамицином», в течение месяца не наблюдали образование микроколоний на питательной среде. Возможность выращивания растений с применением этого антибиотика в данных условиях требует дальнейшей проверки.

Что касается «физических изоляторов», то лучшим вариантом из представленных оказались воск и парафин. Глицерин и желатин подверглись стремительной грибной контаминации: на 13 день заразилась пятая часть пробирок с глицерином и больше половины с желатином. К 20 дню незараженных из них не осталось. В пробирках с покрытием из парафина и воска среда стала заражаться только по истечению месяца. В последующий месяц, в половине случаев изоляционный слой ссыхался, вслед за ним среда отставала от внутренних стенок пробирки и в образовавшийся зазор проникало заражение.

В результате эксперименты был сделан вывод, что применение физических и химических «изоляторов» на последнем этапе клонального микроразмножения оказывает положительное влияние на адаптацию растений.

Библиографический список

1. Gopinath P., Irene Vethamoni P., Gomathi M. Aeroponics Soilless Cultivation System for Vegetable Crops. / P. Gopinath, P. Irene Vethamoni, M. Gomathi // Chemical Science Review and Letters, 2017. №6 (22). – P. 838-849.

2. Шульгина А. А., Калашникова Е. А. Влияние веществ гормональной природы на клональное микроразмножение *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro*. // Труды Кубанского Государственного Аграрного Университета. Материалы IV Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в области генетики, селекции, семеноводства и размножения растений», №3(72), 2018. — С. 382–385.

3. Шишкин П. В. Антипова О. В. Бессубстратная технология гидропонного выращивания. Hydroponics technology to grow plants without soil. // Научно-практический журнал «Овощи России», №3 (36) 2017. – с. 56-61.

УДК 57.083.134:577.17:582.929.4

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР *AGASTACHE MEXICANA* (KUNTH) LINT & EPLING

Поливанова Оксана Борисовна, старший преподаватель кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
Башак Амитабх, магистрант кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Аннотация: В ходе исследования была произведена оценка ростовых показателей суспензионных культур *A. mexicana*, а также динамики

накопления флавоноидов. Для культивирования суспензионных культур использовалась жидкая питательная среда MS (Murashige and Skoog) содержащей 2 мг/мл 2,4-Д и 0,1 мг/мл кинетина, с концентрациями сахарозы 30 г/л и 45 г/л. Увеличение концентрации сахарозы в питательной среде до 4,5 % способствовало приросту как сухой, так и сырой биомассы, стабильному сохранению жизнеспособности, а также увеличивало накопления флавоноидов на всех этапах культивирования.

Ключевые слова: *Agastache mexicana*, вторичные метаболиты, суспензионная культура, жизнеспособность клеток.

В настоящее время суспензионные культуры можно расценивать как надежный, простой и предсказуемый способ накопления растительных вторичных метаболитов на коммерческом уровне, который позволяет избежать таких препятствий как сезонность и воздействие абиотических и биотических факторов при получении растительных фармацевтических продуктов.

Agastache – род растений семейства Lamiaceae, объединяющий более 20 видов многолетних лекарственных ароматических растений, которые широко используются в народной медицине Азиатских стран и Америки для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, бактериальных инфекций, неврологических расстройств.

В последнее десятилетие представители рода *Agastache* стали популярными объектами в биотехнологии растений. При этом основные исследования сфокусированы на 2 видах - *A. rugosa* и *A. foeniculum*. Изучение данных видов в культуре *in vitro* было направлено на разработку эффективных протоколов клонального микроразмножения и на изучения регуляции биосинтеза специализированных вторичных метаболитов, прежде всего розмариновой кислоты.

A. mexicana произрастает на территории Северной Америки, но также широко культивируется по всему миру, как лекарственное, ароматическое, декоративное и медоносное растение. Цветки и надземные части *A. mexicana* являются источником биологически активных соединений, таких как терпены, флавоноиды и фенольные соединения, причем наиболее активными являются урсоловая и олеаноловая кислоты, акацетин, апигенин и тилианин [1]. Среди данных соединений тилианин является наиболее распространенным флавоноидом, содержащимся в больших количествах в водных и метанольных экстрактах. Тилианин обладает различными фармакологическими и биологическими эффектами, такими как противодиабетический, антигиперлипидемический, противовоспалительный и вазорелаксантный, в связи с чем его можно рассматривать как потенциальное лекарственное соединения в терапии неврологических расстройств, сердечно-сосудистых заболеваний и других патологий [1].

Целью данной работы является получение суспензионной культуры *A. mexicana* и оценка ее параметров, таких как жизнеспособность, динамика роста,

накопление флавоноидов с применением питательных сред с различными концентрациями сахарозы.

Для получения суспензионных клеточных культур использовали каллус из листовых эксплантов 6 пассажа, полученный на твердой питательной среде, содержащей 2 мг/мл 2,4-Д и 0,1 мг/мл кинетина. 5 граммов рыхлого каллуса переносили в колбу на 500 мл, содержащую 100 мл жидкой среды MS, с добавлением 2 мг/мл 2,4-Д и 0,1 мг/мл кинетина и 3,0 % и 4,5% (вес/объем) сахарозы. РН доводили до 5,8 перед автоклавированием в течение 25 мин при 121 ° С. Клеточные суспензии инкубировали при 20 ° С на роторном шейкере (100 об/мин) в темноте. Клетки субкультивировали каждые 14 дней путем инокуляции клеточных суспензий в свежую среду (1: 2, об./об.). Для получения кривых роста использовали культуру инокулята в возрасте 14 дней. Рост клеток определяли с интервалами 5-6 дней в течение 6 недель. 1 мл клеточной суспензии переносили в предварительно взвешенную микроцентрифужную пробирку. Пробирку центрифугировали при 10000 об / мин в течение 10 мин. После удаления жидкой среды определяли массу пробирки, содержащей клетки, чтобы оценить массу свежих клеток. Затем пробирку сушили при 70 ° С в течение 48 часов для определения сухой массы [2].

Для оценки жизнеспособности клеток был применен метод подсчета с использованием гемоцитометра и синего красителя Эванса [3]. 2 мл клеточной суспензии инкубировали в 0,25% растворе красителя в течение 5 минут и затем клетки подсчитывали в гемоцитометре. Процент неокрашенных клеток представляет собой процент жизнеспособных клеток в суспензии (% жизнеспособных клеток = количество жизнеспособных клеток / общее количество клеток). Для определения суммарного содержания флавоноидов использовали спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Измерения проводили при 420 нм, результаты выражали в мг/ 100 г эквивалента кверцетина.

Все измерения были выполнены как минимум в трех повторностях.

Ростовые кривые, полученные по значениям сухой и сырой биомассы, представлены на рисунке 1. Как видно из графиков, увеличение концентрации сахарозы в питательной среде способствует приросту, как сырой, так и сухой биомассы на всех этапах культивирования.

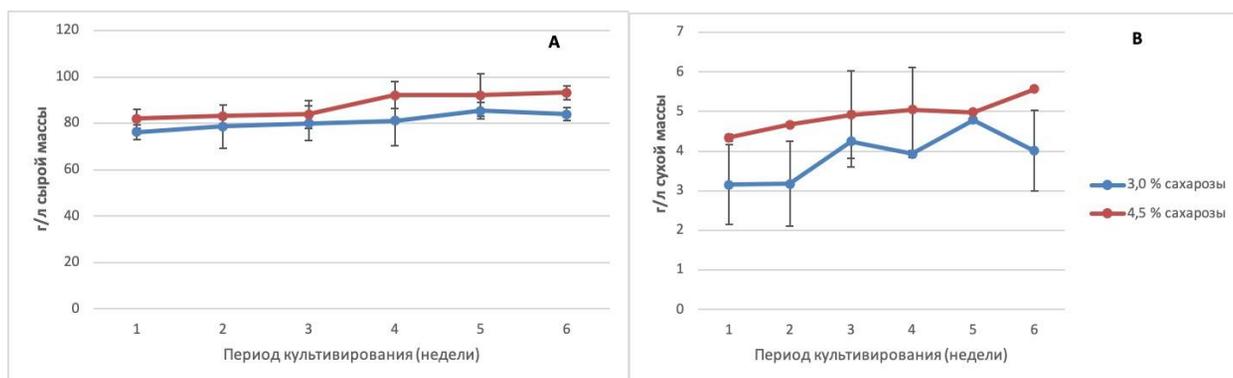


Рис. 1. Кривые роста суспензионной культуры *A. mexicana*, построенные по значению сырой (А) и сухой (В) биомассы

Увеличение концентрации сахарозы в питательной среде является распространенной стратегией увеличения продуктивности суспензионных культур, в том числе и для *Agastache*. Так, на культурах *A. rugosa* было показано, что увеличение концентрации сахарозы до 50 г/л способствует усилению продукции розмариновой кислоты в суспензионной культуре, а также улучшает ростовые характеристики [2].

Аналогичные закономерности были установлены для жизнеспособности и накопления флавоноидов (рисунок 2). Так, на заключительной 6 неделе культивирования суммарное содержание флавоноидов было на 56,25 % выше в суспензионной культуре с увеличенной концентрацией сахарозы.

Жизнеспособность клеток варьировалась от 42,11 % до 82,17 % для питательной среды, содержащей 3,0 % сахарозы, и от 58,39 % до 88,45 % для питательной среды, содержащей 4,5 % сахарозы, на всех этапах культивирования.

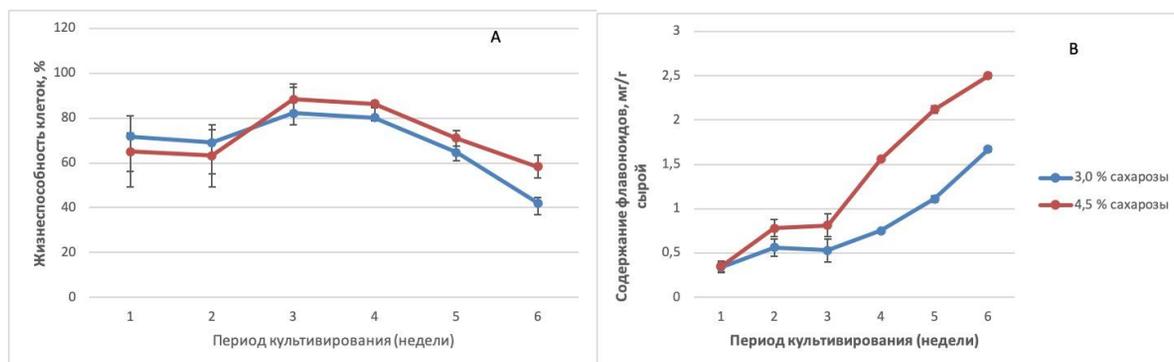


Рис. 2. Оценка жизнеспособности (А) и накопления флавоноидов (В) суспензионных культур *A. mexicana*

Таким образом, увеличение концентрации сахарозы в питательной среде позволяет получить более стабильную и продуктивную суспензионную культуру *A. mexicana* и является доступной стратегией увеличения её биосинтетического потенциала.

Библиографический список

1. Carmona- Castro, G. High accumulation of tilianin in in-vitro cultures of *Agastache mexicana* and its potential vasorelaxant action / G. Carmona- Castro, S. Estrada- Soto, J. Arellano- García, L. Arias- Duran [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2018. – Vol. 46. – P. 1107–1115.
2. Kim, T.H. Volatile flavour compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* Kuntze (Korean mint) / T.H. Kim, J.H. Shin, H.H. Baek, H.J. Lee // J. Sci. Food. Agr. – 2001. – Vol. 81(6). – P. 569–75.
3. Rodríguez-Monroy, M. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank / M. Rodríguez-Monroy., E. Galindo // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – Vol. 24. – P. 687–693.