

3. Закарян А. Е., Элбакян В. Л., Айвазян Н. М., Погосян Г. А. и др. Основы метода хемилюминесцентного анализа и программное обеспечение LABVIEW для автоматической регистрации и математической обработки данных // – 2006, Сб. Трудов конф. “Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LABVIEW и технологии National Instruments”, Москва, 2006, 17-18 ноября, с. 429-432.

ЦИТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬ- ТУРЫ *ECHINACEA PURPUREA*

Дитченко Т.И., Ключанкова М.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Суспензионные культуры растительных клеток имеют ряд преимуществ по сравнению с каллусными тканями, выращиваемыми статическим способом на агаризованной поверхности: клетки популяции находятся в однородных условиях питания и аэрации, являются удобной моделью для исследования влияния различных экзогенных факторов на рост и метаболизм. В зависимости от источника получения и условий культивирования суспензионные культуры могут достаточно сильно различаться. Основными их характеристиками являются скорость роста, плотность, степень агрегированности, жизнеспособность клеток [1]. Признаками хорошей суспензионной культуры служат высокая степень ее дезагрегации, морфологическая однородность клеток (небольшие размеры, сферическая или овальная форма, плотная цитоплазма) и отсутствие дифференциации [2]. Целью настоящей работы явился анализ цитоморфометрических и физиолого-биохимических показателей длительно пассируемой суспензионной культуры клеток *Echinacea purpurea*.

В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга, содержащая 3% сахарозы и фитогормоны: 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л ИУК. Культивирование осуществлялось в условиях термостата при 25°C в темноте. Постоянное перемешивание питательной среды обеспечивалось с помощью орбитального шейкера-инкубатора MaxQ 6000 ThermoScientific при 120 об/мин. Длительность ростового цикла составляла 16 сут.

Скорость прироста биомассы является важнейшей характеристикой любой культуры растительных клеток и тканей *in vitro*. При изучении закономерностей увеличения сухого веса суспензионной культуры *Echinacea purpurea* была получена кривая роста, которая имела лаг-фазу длительностью 3 сут, экспоненциальную фазу – 4–7 сут, линейную фазу – 9–11 сут. Затем рост замедлялся, и с 14-х сут начиналась короткая стационарная фаза, которая длилась до 16 сут, после чего наступала фаза деградации. Кривая роста имела типичную S-образную форму.

При субкультивировании суспензионных культур необходимо контролировать их плотность. Если начальная плотность снижается ниже минимальной критической величины, суспензионная культура не будет расти, а при плотности, значительно превышающей оптимальный уровень, удлинится лаг-фаза и фаза экспоненциального роста [3]. В связи с этим было исследовано влияние величины начального объема инокулюма на прирост биомассы суспензионной культуры *Echinacea purpurea*. Установлено, что при его увеличении от 2 до 4 г/л наблюдалось возрастание сухого веса в стационарной фазе в 1,4 раза. Дальнейшее повышение начальной плотности культуры до 6 г/л не приводило к дополнительному увеличению максимального уровня накопления биомассы к концу цикла выращивания. Расчеты показали, что наиболее высокое значение индекса роста ($4,3 \pm 0,3$) отн. ед. отмечалось при использовании первоначального объема инокулюма, равного 2 г/л. Полученные данные позволяют заключить, что изначально высокая плотность суспензионной культуры может приводить к дальнейшему торможению прироста биомассы, что вероятно связано с более быстрым истощением питательной среды.

Суспензионные культуры растительных клеток никогда не бывают однородными, состоящими только из одиночных клеток. По степени агрегированности в суспензии обычно различают четыре основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. В зависимости от их соотношения суспензионные культуры бывают слабоагрегированными, среднеагрегированными и высокоагрегированными [3]. Проведенный анализ степени агрегированности суспензионной культуры *Echinacea purpurea* показал, что процент одиночных клеток и мелких агрегатов в течение всего ростового цикла поддерживался практически на постоянном уровне – 23–26% и 42–46%, соответственно. Преобладание указанных фракций позволяет отнести исследуемую суспензионную культуру к слабоагрегированному типу.

Популяции культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей обычно содержат клетки, которые сильно варьируют по форме и разме-

рам. Суспензионные культуры наряду с делящимися мелкими сферическими клетками могут включать более крупные, удлинённые вакуолизованные клетки, которые чаще всего полиплоидны [2]. Следует отметить, что суспензионная культура *Echinacea purpurea* характеризовалась слабой морфологической гетерогенностью. Основную массу суспензии составляли клетки сферической либо овальной формы, которые незначительно различались по размерам. Следовательно, суспензионная культура *Echinacea purpurea* в результате длительного пассирования приобрела признаки достаточно стабильной клеточной суспензии, для которой характерна морфологическая однородность клеток.

Определение степени жизнеспособности суспензионной культуры *Echinacea purpurea* показало, что количество жизнеспособных клеток составляет не менее 95%. Анализ их метаболической активности, проведенный с помощью тетразолиевого теста, позволил установить 1,5-кратное повышение дегидрогеназной активности при переходе культуры из лаг-фазы в лог-фазу ростового цикла. Затем к фазе замедления роста активность окислительно-восстановительных процессов снижалась (в среднем в 1,2 раза) и поддерживалась на одном уровне в течение стационарной фазы.

С целью характеристики биосинтетического потенциала суспензионной культуры *Echinacea purpurea* производилось количественное определение содержания растворимых фенольных соединений, а также отдельных их классов – гидроксикоричные кислоты (ГКК) и флавоноиды. Установлено, что ГКК и их производные представляют собой доминирующую группу фенольного комплекса. С помощью ВЭЖХ-анализа в экстрактах из суспензионной культуры *Echinacea purpurea* были идентифицированы кафтаровая, хлорогеновая, кофейная, цикориевая и феруловая кислоты. Содержание ГКК находилось практически на одинаковом уровне в лаг- и лог-фазы ростового цикла, тогда как к стационарной фазе происходил рост уровней их накопления. Уровни накопления флавоноидов мало изменялись в течение ростового цикла. На основании полученных результатов можно заключить, что суспензионная культура *Echinacea purpurea* сохраняет присущую интактному растению способность к синтезу вторичных метаболитов фенольной природы и, учитывая ее цитоморфометрические и физиолого-биохимические характеристики, может выступать в качестве альтернативы традиционно используемому лекарственному сырью.

Литература

1. Современные проблемы и методы биотехнологии [электронный ресурс] / Н.А. Войнов [и др.]: под науч. ред. Т. Г. Волковой. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 418 с.
2. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – Москва ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина [и др.]; под общ. ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЕПониРОВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ECHINACEA*

Дитченко Т.И., Кривелева А.Н., Юрин В.М.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В основе технологии депонирования, либо длительного беспересадочного культивирования растительных объектов *in vitro* лежит создание условий, индуцирующих устойчивое в течение нескольких месяцев (до года) торможение ростовых процессов вплоть до состояния физиологического покоя. При работе с коллекциями культур клеток и тканей растений, в частности, продуцентов фармакологически активных метаболитов, важным этапом является установление эффективных способов депонирования, позволяющих с минимальными затратами сохранять ценный исходный материал в неизменном виде, снизить трудоемкость поддержания пересадочных культур и т.д. С целью увеличения продолжительности беспересадочного культивирования растительных объектов *in vitro* используют несколько методических приемов: снижение температуры культивирования, добавление в питательные среды соединений, способных замедлять рост, создание условий гипоксии. В качестве ингибиторов ростовых процессов применяют осмотические агенты, такие как D-маннит, сорбит, сахараза в повышенных концентрациях, или вещества гормональной природы – абсцизовая кислота, гидразид малеиновой кислоты, хлорхолинхлорид (ССС) и др. Для ряда культур показано, что наибольшего эффекта можно достигнуть в результате комбинирования разных приемов лимитирования роста [1]. Однако возможности этой технологии не могут быть реализованы в равной степени для разных растительных объектов. В связи