

Егорова Н. А.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ЛАВАНДЫ**

ФГБУН «Научно исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. Лаванда узколистная является одним из наиболее распространенных на юге России эфиромасличных растений, которое широко используют в парфюмерно-косметической, пищевой промышленности, медицине. При разработке клеточных технологий этого вида важен выбор подходящего биотехнологического объекта и режимов культивирования *in vitro*. Цель данной работы – оптимизация условий получения культуры клеточной суспензии лаванды и ее характеристика. Материалом для исследований служили ткани и органы растений лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Степная. Каллус получали из эксплантов листа и культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Для получения первичной суспензионной культуры каллусную ткань переносили в колбы с жидкой питательной средой и культивировали на качалке. При оптимизации условий длительного выращивания суспензионной культуры изучено влияние на ее основные параметры (плотность, жизнеспособность и агрегированность) исходной плотности суспензии, гормонального состава питательной среды и длительности культивирования в цикле выращивания. Установлено, что лучший рост суспензии обеспечивала питательная среда того же состава, что и для индукции каллуса (МС с НУК и БАП), исходная плотность для субкультивирования суспензии – $1,8-2,0 \times 10^4$ клеток/мл и скорость вращения качалки – 90 оборотов/мин. Дана цитофизиологическая характеристика популяции клеток в цикле выращивания суспензии и определена продолжительность основных фаз цикла выращивания. За цикл выращивания у лаванды при глубинном культивировании происходило увеличение плотности суспензии в 22 раза. Показано, что ростовой цикл суспензионной культуры и длительность основных его фаз короче, чем у каллусной ткани. Стационарная фаза популяции клеток начиналась на 14-е сутки культивирования. Во всех фазах цикла выращивания жизнеспособность клеток достигала 69,7–81,2 %. Содержание одноклеточной фракции варьировало от 19,8 до 33,4 %, и в стационарной фазе составило 30,8 %. Разработанные режимы длительного культивирования клеточной суспензии обеспечивали ее хороший рост в течение трех–четырёх лет. Показана возможность использования суспензионной культуры лаванды для одноклеточного клонирования.

Ключевые слова: лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.), культура клеточной суспензии, питательная среда, *in vitro*, агрегированность и плотность суспензии.

Введение

В настоящее время в растениеводстве активно используют биотехнологические приемы, которые позволяют создавать новые генотипы для селекции, ускоренно размножать оздоровленный посадочный материал в семеноводстве, решать задачи сохранения биоразнообразия, получать ценные биологически активные вещества в изолированных культурах, а также преодолевать многие другие проблемы, возникающие при использовании традиционных методов [1]. При разработке клеточных технологий важен выбор подходящего биотехнологического объекта и оптимизация условий его

культивирования *in vitro*. В разных биотехнологиях используют культуры изолированных органов (например, меристемы, зиготические зародыши, пыльники), каллусы, клеточные суспензии, протопласты [2, 3]. Одним из относительно сложных, но эффективных объектов является суспензионная культура, которая представляет собой выращивание отдельных клеток или их групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде с использованием аппаратуры, обеспечивающей их перемешивание и аэрацию. Суспензионная культура имеет много преимуществ по сравнению с другими биотехнологическими объектами. Из суспензии легче выделить одиночные клетки, поэтому ее можно успешно использовать в клеточной селекции для отбора мутантных клеток, получения устойчивых к стрессовым факторам генотипов растений или клеточных линий-продуцентов вторичных метаболитов [2, 4, 5]. Благодаря культивированию в жидкой среде при перемешивании, в суспензионной культуре клетки лучше снабжаются питательными веществами и пролиферируют, это также позволяет лучше контролировать их развитие. Суспензионная культура более «технологична», так как ее легче пассировать, заменять питательную среду, выделять продукты и управлять ростом клеток в больших масштабах при культивировании в ферментерах. Поэтому у многих видов растений в биотехнологиях получения вторичных метаболитов *in vitro* часто применяют не каллусную, а суспензионную культуру, что позволяет не только повысить выход продукта, но и перейти к крупномасштабному производству [2, 6]. При получении устойчивых к абиотическим стрессам и болезням генотипов в клеточной селекции, несмотря на широкое использование каллусных тканей, часто для отбора *in vitro* устойчивых клеток, а затем линий и растений-регенерантов также применяют суспензионные культуры [7, 8].

Лаванда узколистая – одно из наиболее распространенных на юге России эфиромасличных растений [9]. Лавандовое эфирное масло широко используют в парфюмерно-косметической, пищевой промышленности, керамическом и лакокрасочном производстве. В медицине препараты из этого растения применяют как ранозаживляющие, успокаивающие и спазмолитические средства, рекомендуемые при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, желудочно-кишечных, кожных и многих других болезнях [10]. Некоторые виды и сорта лаванды используют в декоративном садоводстве, а также как противоэрозийные растения. Поэтому растения рода *Lavandula* достаточно интенсивно изучают в области ботаники, биохимии, фармакологии, селекции [9, 11, 12].

Биотехнологические исследования видов лаванды большей частью связаны с оптимизацией условий клонального микроразмножения *in vitro* [13–17]. В этих работах в качестве эксплантов авторы в основном использовали меристемы из пазушных и апикальных почек или сегменты стебля с узлом, и гораздо реже – индукцию адвентивного побегообразования из сегментов листьев и побегов. Хотя существуют данные об использовании для микроразмножения выращиваемой в биореакторе суспензионной культуры *L. angustifolia* сорта Munstead [18]. Менее активно разрабатывают клеточные технологии, направленные на создание новых генотипов и получение исходного материала для селекции. Эти работы в основном проводят с использованием культуры каллусных тканей [19–22]. Значительная часть публикаций по биотехнологии лаванды посвящена изучению биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. В последние два десятилетия они в основном направлены на создание альтернативных биотехнологий получения коммерчески ценных соединений – фенольных кислот (розмариновой, кофейной, феруловой), компонентов эфирного масла, пигментов [20, 23–25]. При этом наиболее

эффективным для получения продуктов вторичного метаболизма было культивирование клеточных суспензий в биореакторе [26, 27].

С целью интенсификации селекционного процесса в ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводят разработку нескольких клеточных технологий, связанных с созданием исходного селекционного материала (получение соматклонов, мутагенез и клеточная селекция *in vitro*), а также клонального микроразмножения [17, 21, 22]. Для некоторых биотехнологий (особенно клеточной селекции и получения веществ вторичного метаболизма) перспективно использование клеточных суспензий. Однако, имеющиеся общие рекомендации по получению суспензионных культур [1, 28], а также данные о приемах культивирования суспензий отдельных видов лаванды [23, 25, 26, 29] весьма противоречивы, а параметры полученных культур часто не представлены. Это обуславливает необходимость подбора питательной среды и режима культивирования для получения суспензионной культуры лаванды, пригодной для разных клеточных технологий.

Цель исследований – оптимизация условий получения культуры клеточной суспензии *L. angustifolia* и ее характеристика.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили ткани и органы растений лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Степная. Исходные растения выращивали в условиях закрытого грунта. В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы культуры органов и тканей растений [28], а также разработанные нами ранее [30]. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). В качестве эксплантов для получения каллусов использовали сегменты листовой пластинки. При введении в культуру растительный материал промывали 20–30 минут в мыльном растворе, а затем в проточной и дистиллированной воде. Стерилизацию растительного материала проводили при использовании 70 ° этанола (1 мин), а затем 50 % раствора препарата «Брадофен» (Флорин АО, Венгрия) в течение 10 минут. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [28] с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП) (Sigma, США). Культивирование каллусов проводили в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды, а суспензионных культур – в колбах на 250 мл с 50 мл жидкой среды. Изолированные ткани и клетки культивировали при 26 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности 600 люкс с шестнадцатичасовым фотопериодом. Каллусные ткани пассировали в асептических условиях каждые 30–35 сут. Масса каллусного транспланта составляла 90–100 мг. Для получения суспензионной культуры 2–3 г каллуса помещали в колбы с 50 мл жидкой питательной среды и культивировали на качалке («УВМТ-12-250») со скоростью вращения 90 оборотов в минуту. При пассировании суспензии через 14–18 суток отбирали инокулюм с плотностью от 0,9 до $18,4 \times 10^4$ клеток/мл, который переносили в колбы со свежей жидкой питательной средой. Опыты по культуре тканей проводили в трехкратной повторности, в каждом варианте анализировали не менее 20 каллусных трансплантов или трех колб с суспензией. Каждый эксперимент проводили в двукратной повторности.

В процессе культивирования визуально анализировали морфологию каллусных и суспензионных культур. Определение цитофизиологических параметров популяции клеток суспензионной культуры в цикле выращивания проводили в течение трех недель через каждые двое суток культивирования. При этом измеряли плотность суспензии, жизнеспособность и агрегированность клеток [28, 30]. Для определения плотности (количества клеток в 1 мл суспензии)

отбирали инокулом и после мацерации в 20 % хромовой кислоте (при 60 °С в течение 40 мин) подсчитывали число клеток в камере Фукса-Розенталя в шестикратной повторности. Агрегированность определяли по соотношению различных клеточных агрегатов, выделяя следующие классы: одиночные клетки, агрегаты из 2–5 клеток, 6–20 клеток, 21–50 клеток и более 50 клеток. Подсчитывали по 100 клеточных агрегатов в шестикратной повторности. Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 0,5 % метиленовым синим (анализировали не менее 500 клеток в трехкратной повторности).

Статистическую обработку данных осуществляли согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета Microsoft Office Excel (2010). Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки, а на графиках – средние значения и доверительные интервалы.

Результаты и их обсуждение

Для получения суспензионной культуры можно использовать два основных методических приема [1]. Один из них – помещение в жидкую питательную среду листовых эксплантов, на поверхности которых формируется первичный каллус. При автоматическом перемешивании отдельные клеточные агрегаты отделяются в среду. Часто для индукции клеточной суспензии в жидкую питательную среду переносят каллусную ткань, однако для этого она должна быть достаточно рыхлой, чтобы легко распадаться на клеточные агрегаты в условиях постоянного перемешивания на качалке. В наших экспериментах каллус лаванды, полученный из сегментов листьев на агаризованной питательной среде МС160 (с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП), был преимущественно рыхлый, мягкий, оводненный, светло-бежевого цвета или почти бесцветный (рисунок 1А). Поэтому для получения первичной суспензионной культуры лаванды использовали второй методический прием – в колбы с жидкой питательной средой в асептических условиях переносили каллус и культивировали на качалке. При переносе каллуса в жидкую среду того же состава он легко распадался на клеточные агрегаты различного объема. Полученная первичная суспензионная культура имела достаточно хорошую жизнеспособность (до 69,2 %), но низкое содержание одноклеточной фракции (6–10 %). Для длительного выращивания клеточной суспензии определенный объем инокулома переносили в колбу со свежей жидкой питательной средой и помещали на качалку с круговым вращением (рисунок 1Б). В предварительных опытах установлено, что оптимальной скоростью вращения качалки является 90 об./мин, поэтому использовали именно этот режим.



А



Б

Рисунок 1 – Каллусная ткань лаванды на агаризованной питательной среде (А) и культивирование суспензионных культур в жидкой питательной среде на качалке (Б)

В ходе дальнейшей оптимизации условий для длительного выращивания суспензионной культуры лаванды изучали влияние на ее основные параметры (плотность, жизнеспособность и агрегированность) исходной плотности, состава питательной среды и длительности культивирования в цикле выращивания (таблица 1). Анализировали три варианта питательной среды МС – оптимальную для роста каллуса среду с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП (МС 160), среду с увеличенной вдвое концентрацией этих гормонов (МС 279), и питательную среду, содержащую только ауксин НУК (МС 280).

Таблица 1 – Влияние исходной плотности и питательной среды на плотность и жизнеспособность суспензионной культуры лаванды сорта Степная

№ питательной среды МС (содержание регуляторов роста, мг/л)	Исходная плотность, число клеток $\times 10^4$ /мл	Плотность в цикле выращивания, число клеток $\times 10^4$ /мл		Прирост плотности за 14 сут, % к исходной	Доля жизнеспособных клеток на 14 сут, %
		7 сут	14 сут		
МС 160 (1,0 НУК + 0,5 БАП)	0,9	19,0 ± 0,8	23,8 ± 0,7	2644,0	78,6 ± 0,6
	1,8	29,1 ± 1,1	32,4 ± 1,2	1800,0	77,7 ± 2,3
	2,6	23,5 ± 1,5	48,9 ± 1,8	1880,8	65,6 ± 1,9
	6,4	17,8 ± 1,3	42,7 ± 1,9	667,2	59,9 ± 1,8
	12,9	35,4 ± 1,5	75,5 ± 1,8	585,3	60,3 ± 1,7
	18,4	37,2 ± 1,8	78,9 ± 2,0	428,8	56,8 ± 1,4
МС 279 (2,0 НУК + 1,0 БАП)	0,9	16,8 ± 0,7	24,8 ± 1,1	2755,6	63,6 ± 1,3
	1,8	29,9 ± 1,3	41,4 ± 1,9	2300,0	72,9 ± 1,2
	2,6	23,8 ± 1,1	60,2 ± 2,1	2307,7	49,6 ± 1,1
	6,4	18,5 ± 0,7	57,8 ± 1,8	903,1	52,3 ± 1,4
	12,9	21,4 ± 0,8	62,4 ± 1,8	483,7	59,7 ± 1,3
МС 280 (2,0 НУК)	0,9	12,2 ± 0,6	17,7 ± 0,6	1966,7	81,8 ± 1,3
	1,8	20,3 ± 0,9	26,5 ± 1,0	1472,2	71,5 ± 1,9
	2,6	19,4 ± 1,0	38,7 ± 1,1	1488,5	62,3 ± 1,5
	6,4	12,6 ± 0,5	31,6 ± 1,2	493,7	66,2 ± 1,8
	12,9	50,8 ± 2,0	75,8 ± 1,9	587,6	60,5 ± 1,9
	18,4	29,2 ± 0,8	64,5 ± 1,7	350,5	52,1 ± 1,3

Как видно из представленных данных, величина исходной плотности оказывала значительное влияние на темпы прироста плотности клеточной суспензии и другие показатели. Наибольшая плотность достигалась при использовании объемов инокулюма, обеспечивающих исходную плотность суспензии 2,6–18,4 $\times 10^4$ клеток/мл. Однако, только при относительно низких значениях исходной плотности (0,9–2,6 $\times 10^4$ клеток/мл) наблюдали 20–27-кратный прирост этого показателя за две недели культивирования. При дальнейшем увеличении исходной плотности происходило снижение активности роста культуры; отмечали всего 3–9-кратное увеличение числа клеток в 1 мл суспензии. Следует отметить, что при использовании исходной плотности 2,6 $\times 10^4$ клеток/мл и выше после двух недель культивирования суспензия становилась очень густой, и в колбе образовывался «ободок» из массы темных нежизнеспособных клеток. Все это отрицательно влияло на жизнеспособность клеточной популяции, которая снижалась до 49–53 %. Поэтому у лаванды целесообразно использовать исходную плотность 1,8–2,0 $\times 10^4$ клеток/мл, при которой за две недели культивирования происходил почти 20-кратный прирост плотности, и жизнеспособность составляла 72–77 %.

Гормональный состав питательной среды также оказывал существенное влияние на изменение ростовых параметров суспензии. В частности, наибольший прирост плотности достигался на средах, содержащих ауксин и цитокинин (МС 160,

МС 279). Особо четко проявилось влияние состава питательной среды на степень агрегированности культуры (рисунок 2). Только на среде МС 160 отмечено высокое содержание одноклеточной фракции (от 15,2 до 43,4 %, в зависимости от исходной плотности). На остальных средах формировались в основном многоклеточные агрегаты, а одиночные клетки составили всего 3,5–8,9 % от общего числа анализируемых. Учитывая необходимость высокого содержания одноклеточной фракции для проведения ряда манипуляций при клеточной инженерии (например, одноклеточного клонирования), более подходящей средой для культивирования суспензии лаванды является та же питательная среда МС 160, которую использовали для получения и субкультивирования каллусной ткани.

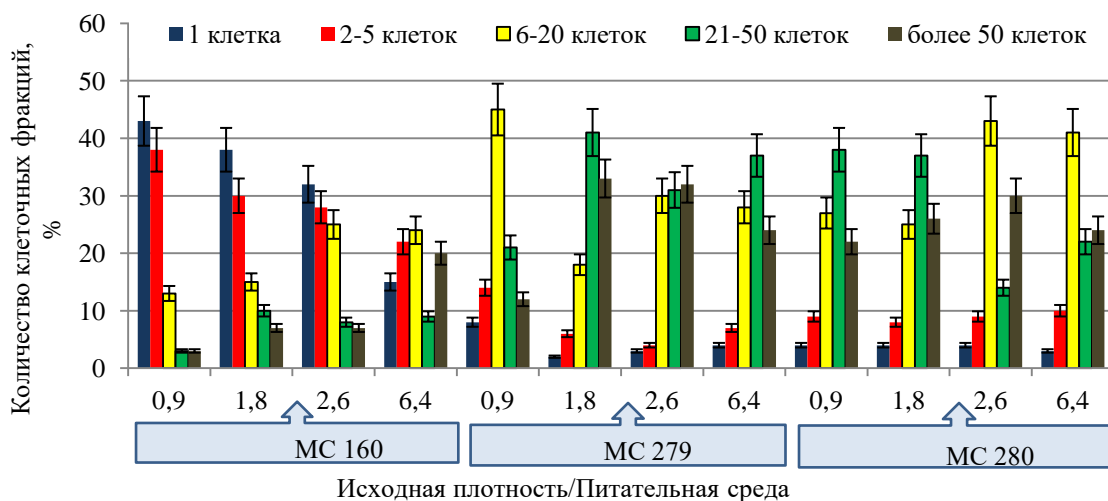


Рисунок 2 – Влияние исходной плотности суспензии (число клеток ×10⁴/мл) и питательной среды на агрегированность суспензионной культуры лаванды сорта Степная (14-е сут культивирования)

Проведено изучение динамики роста суспензионной культуры лаванды (четвертого пассажа) на протяжении трех недель, что позволило определить продолжительность основных фаз цикла выращивания. Культивирование проводили при использовании жидкой среды МС 160 и исходной плотности $2,0 \times 10^4$ клеток/мл. В опыте анализировали плотность (основной показатель, характеризующий рост суспензии), агрегированность и жизнеспособность популяции соматических клеток. За цикл выращивания у лаванды при глубинном культивировании происходило увеличение плотности почти в 22 раза (рисунок 3). Ростовой цикл суспензионной культуры и длительность основных его фаз оказались гораздо короче, чем у каллусной ткани лаванды [31], что обуславливает меньшую продолжительность пассажа. Латентный период составил всего одни сутки, экспоненциальную и линейную фазы роста отмечали на четвертые и восьмые сутки культивирования. Переход популяции в стационарную фазу происходил, начиная с 14-х суток культивирования. Поэтому оптимальная продолжительность цикла выращивания суспензии лаванды – 14–18 суток. Во всех фазах цикла выращивания отмечали высокую жизнеспособность соматических клеток – до 69,7–81,2 %. Содержание одноклеточной фракции варьировало от 19,8 до 33,4 %, и в стационарной фазе составило 30,8 % (рисунок 4). Это свидетельствует о возможности эффективного использования для выделения одиночных клеток суспензионной культуры, выращиваемой при данных условиях.

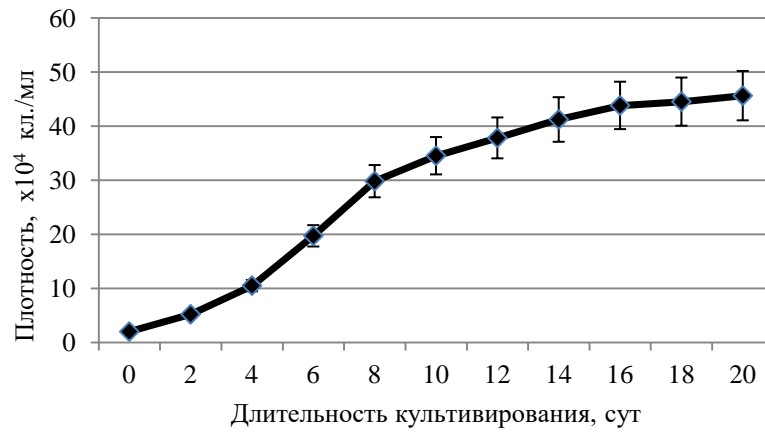


Рисунок 3 – Динамика изменения плотности клеточной популяции в цикле выращивания суспензионной культуры лаванды сорта Степная

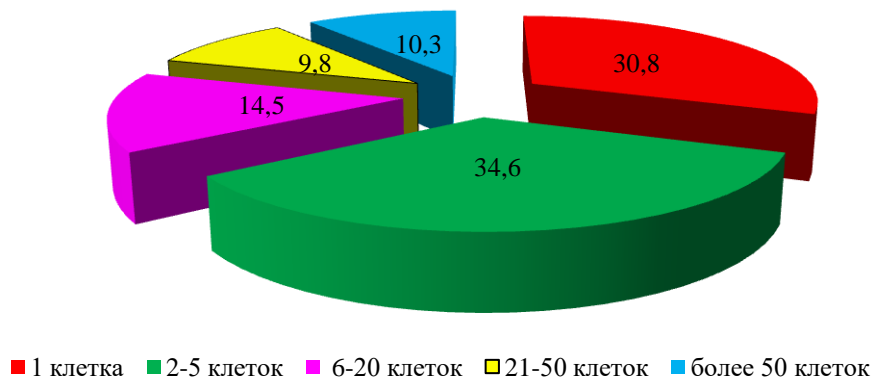


Рисунок 4 – Агрегированность суспензионной культуры лаванды сорта Степная на стационарной фазе цикла выращивания (доля клеточных фракций, %)

В результате этих исследований были оптимизированы условия культивирования суспензионной культуры лаванды, включающие питательную среду, исходную плотность, длительность пассажа и скорость вращения качалки. Полученные культуры содержали высокую долю одноклеточной фракции, что очень важно при проведении одноклеточного клонирования и последующей клеточной селекции. Показана возможность использования таких клеточных суспензий для одноклеточного клонирования с применением метода «плейтинга» в модификации Бергмана [28]. Такой методический прием используют, например, в клеточной селекции для отбора единичных генетически измененных клеток. Для получения достаточного количества колоний и их хорошего роста важное значение имеет исходная плотность суспензии и жизнеспособность культур. Для высева клеток на агаризованную питательную среду отбирали суспензии с жизнеспособностью не ниже 50–60 % и небольшим средним размером агрегата – 1,7–1,8 клеток, то есть с содержанием одноклеточной фракции не менее 75,0 %. Эффективность платирования зависела от плотности высева, и при сравнении двух вариантов ($2,5 \times 10^4$ кл/мл и $3,6 \times 10^4$ кл/мл) показано, что большая исходная плотность обеспечила более высокую эффективность платирования – 0,05 %. При этом через 1,5 месяца в среднем формировалось 153,5 колоний на одну чашку Петри. После субкультивирования таких клеточных агрегатов на свежую среду в

пробирки развивалась каллусная ткань с хорошим приростом биомассы (ростовой индекс достигал 12–15).

Таким образом, установлено, что для получения клеточной суспензии лаванды узколистной более подходящей является та же питательная среда, что и для индукции каллусогенеза (МС с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП). У *L. vera* культивирование суспензионной и каллусной культур также проводили на среде одного состава, однако в качестве основной использовали питательную среду Линсмайера-Скуга, в которую добавляли 2,4-Д [26, 29]. Для получения клеточных суспензий разных видов лаванды в качестве гормональной добавки часто применяли 2,4-Д (в концентрации от 0,2 до 1,0 мг/л), способствующую лучшей дезагрегации каллуса [25, 27, 32]. Однако в наших предварительных исследованиях показано, что этот ауксин негативно влиял на рост каллусной и суспензионной культур лаванды. В представленном эксперименте на среде с НУК и БАП каллус был достаточно рыхлым, и формирующаяся из него суспензионная культура характеризовалась высоким содержанием мелких клеточных агрегатов и одиночных клеток.

В результате анализа динамики изменения плотности клеточной популяции в цикле выращивания выявлено, что стационарная фаза у суспензионной культуры наступала через две недели культивирования (при используемых нами условиях). Это обуславливает оптимальную продолжительность цикла выращивания суспензии 14–18 суток, что почти в два раза короче, чем ранее было показано для каллусной культуры лаванды [31]. В работе болгарских ученых у суспензионной культуры *L. vera* отмечено отсутствие четкой логарифмической фазы и максимальное накопление биомассы уже на восьмые сутки [26]. В то же время М. R. S. Ardekanі с соавторами наблюдали наибольшую плотность клеток в суспензионной культуре *L. angustifolia*, начиная с 10–12 суток культивирования в колбах на качалке [32].

Полученные в результате экспериментов суспензионные культуры разных штаммов и сортов лаванды узколистной в дальнейшем использовали для изучения накопления вторичных метаболитов *in vitro* (голубого пигмента, компонентов эфирного масла и др.). Выявленные условия для одноклеточного клонирования могут быть основой для отбора линий, устойчивых к абиотическим стрессам, в экспериментах по клеточной селекции, а также для других биотехнологических исследований этого вида растения.

Выводы

Разработаны режимы получения и длительного культивирования клеточной суспензии для лаванды узколистной, которые обеспечивали ее хороший рост в течение трех–четырёх лет. Подобрана питательная среда (МС с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП), исходная плотность для субкультивирования суспензии ($1,8\text{--}2,0 \times 10^4$ клеток/мл) и скорость вращения качалки (90 об./мин). Дана цитофизиологическая характеристика популяции клеток в цикле выращивания суспензии и определена продолжительность основных фаз цикла выращивания. Культивирование суспензии при разработанных условиях обеспечивало 22-кратный прирост плотности за две недели, жизнеспособность на уровне 69,7–81,2 % и высокое содержание одноклеточной фракции (до 30,8–33,4 %). Показана возможность использования суспензии для одноклеточного клонирования.

Литература

1. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: Учебное пособие. М.: издательство РГАУ-МСХА, 2012. 318 с.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Киев: Логос, 2005. 730 с.

3. Круглова Н. Н., Титова Г. Е., Сельдмирова О. А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49. №5. С.273–288. DOI: 10.1134/S0475145018050038.
4. Kochkin D. V., Glagoleva E. S., Nosov A. M., Galishev B. A., Titova M. V. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg₁) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russian Journal of Plant Physiology. 2017. Vol. 64. No. 5. P. 649–656. DOI: 10.7868/S0015330317050037.
5. Ханды М. Т., Кочкин Д. В., Томилова С. В., Галишев Б. А., Суханова Е. С., Ключин А. Г., Иванов И. М., Носов А. М. Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. – продуцента стероидных гликозидов // Биотехнология. 2016. Т. 32. № 4. С. 21–30.
6. Носов А. М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. № 5. С. 8–28.
7. Сергеева Л. Е., Бронникова Л. И. Клеточная селекция с использованием катионов Ва²⁺ для отбора солеустойчивых линий пшеницы // Физиология растений и генетика. 2017. Т. 49. № 2. С. 174–178.
8. Jan N., Qazi H., Ramazan S., John R. Developing stress-tolerant plants through *in vitro* tissue culture: family Brassicaceae. In book: Biotechnologies of Crop Improvement. Vol. 1. // Ed. by Gosal S. S., Wani S. H. Springer International Publishing AG, 2018. P. 327–372. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_10.
9. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнев А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
10. Niksic H., Kovač-Bešović E., Makarević E., Durić K., Kusturica J., Muratovic S. Antiproliferative, antimicrobial, and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil // Journal of Health Sciences. 2017. Vol. 7. No. 1. P. 35–43. DOI: <https://doi.org/10.17532/jhsci.2017.412>.
11. Бочкарёв Н. И., Зеленцов С. В. Современное состояние таксономии, морфологии и селекции лаванды // Масличные культуры. 2013. Вып. 2. С. 155–156.
12. Salehi B., Mnayer D., Özçelik B., Altin G., Kasapoğlu K. N., Daskaya-Dikmen C., Sharifi-Rad M., Selamoglu Z., Acharya K., Sen S., Matthews K. R., Fokou P. V. T., Sharopov F., Setzer W. N., Martorell M., Sharifi-Rad J. Plants of the genus *Lavandula*: from farm to pharmacy // Natural Product Communications. 2018. Vol. 13 (10). P. 1385–1402.
13. Soni D. R., Sayyad F. G., Sodhi G. K. Micropropagation studies in *Lavandula aungustifolia* // Bioscience, Bioengineering and Biotechnology. 2014. Vol. 1. P. 7–10.
14. Zuzarte M., Dinis A. M., Salgueiro L., Canhoto J. A rapid and efficient protocol for clonal propagation of phenolic-rich *Lavandula multifida* // J. Agricultural Science. 2015. Vol. 7. No. 3. P. 8–17.
15. Mitrofanova I. V., Chirkov S. N., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Chelombit S. V., Zakubanskiy A. V., Rabotyagov V. D., Mitrofanova O. V. Micropropagation of *Lavandula angustifolia* Mill. 'Record' and 'Belyanka' // Acta Hort. 2017. Vol. 1187. P. 37–42. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1187.4.
16. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Agalar H. G., Khawar K. M., Kirimer N. *In vitro* propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. *subsp. stoechas* – an economically important source of essential oil // Records of Natural Products. 2019. Vol. 13. No. 2. P. 121–128.
17. Yegorova N. A., Mitrofanova I. V., Brailko V. A., Grebennikova O. A., Paliy A. E., Stavtseva I. V. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-term micropropagation *in vitro* // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66. No. 2. P. 326–334. DOI: 10.1134/S1021443719010060.
18. Xiaojun W., Liang J., Mei L., Minan Z., Haiqing Z., Yaozu X. Bioreactor culture and plant regeneration from cell clusters of the aromatic plant, *Lavandula angustifolia* 'Munstead' // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2007. Vol. 82. No. 5. P. 781–785.
19. Tsuru M., Inoue M., Kameoka H. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* D.C.) plants // Sci. Hort. 2001. Vol. 88. No. 4. P. 309–317.
20. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2013. Vol. 31. P. 166–174.
21. Егорова Н. А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллусо- и морфогенеза, использование соматональной вариабельности // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 2. С. 108–120.
22. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Разработка селективной системы *in vitro* для получения каллусных линий лаванды, устойчивых к низкой температуре // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 4 (67). С. 48–51. DOI: 10.21515/1999-1703-67-48-51.
23. Georgiev M., Georgiev V., Penchev P., Antonova D., Pavlov A., Ilieva M., Popov S. Volatile metabolic profiles of cell suspension cultures of *Lavandula vera*, *Nicotiana tabacum* and *Helianthus annuus*, cultivated under different regimes // Eng. Life Sci. 2010. Vol. 10. No. 2. P. 148–157. DOI: 10.1002/elsc.200900090.

24. Patel S., Gaur R., Upadhyaya M., Mathur A., Mathur A. K., Bhakuni R. S. *Glycyrrhiza glabra* (Linn.) and *Lavandula officinalis*(L.) cell suspension cultures-based biotransformation of β -artemether // Journal of Natural Medicines. 2011. Vol. 65. No. 3–4. P. 646–650.
25. De Bona C. M., Santos G. D., Biasi L. A. *Lavandula* calli induction, growth curve and cell suspension formation // Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2012. Vol.7. No. 1. P. 17–23. DOI: 10.5039/agraria.v7i1a1121.
26. Pavlov A. I., Georgiev M. I., Ilieva M. P. Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: effect of dissolved oxygen concentration and agitation // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21. No. 4. P. 389–392.
27. Georgiev M., Abrashev R., Krumova E., Demirevska K., Ilieva M., Angelova M. Rosmarinic acid and antioxidant enzyme activities in *Lavandula vera* MM cell suspension culture: a comparative study // Appl Biochem Biotechnol. 2009. Vol. 159. P. 415–425. DOI: 10.1007/s12010-008-8437-3.
28. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
29. Ilieva-Stoilova M. P., Pavlov A. I., Kovatcheva-Apostolova E.G. Further research into *Lavandula* species. Cell cultures of *L. vera* and rosmarinic acid production. Lavender. The genus *Lavandula* // Ed. by Lis-Balcnin M. London, New York: publ. by Taylor and Francis, 2002. P. 214–226.
30. Егорова Н. А. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре лаванды и их микроразмножение *in vitro* (методические рекомендации). Симферополь: издательство ИЭИР УААН, 2008. 28 с.
31. Егорова Н. А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2017. № 1 (9). С. 16–27.
32. Ardekani M. R. S., Linley P. A., Harkiss K. J., Mohagheghzadeh A., Gholami A., Mosaddeg M. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* // Iranian J. of Pharmaceutical Sciences. 2007. Vol. 3. No. 2. P. 93–100.

References

1. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants: Textbook. Moscow: Publishing house of Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy (RSAU – MAA), 2012. 318 p.
2. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic and physiological and biochemical basis. Kiev: Logos, 2005. 730 p.
3. Kruglova N. N., Titova G. E., Seldimirova O. A. Callusogenesis as an *in vitro* morphogenesis pathway in cereals // Russian Journal of Developmental Biology “Ontogenez”. 2018. Vol. 49. No. 5. P.273–288. DOI: 10.1134/S0475145018050038.
4. Kochkin D. V., Glagoleva E. S., Nosov A. M., Galishev B. A., Titova M. V. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg₁) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russian Journal of Plant Physiology. 2017. Vol. 64. No. 5. P. 649–656. DOI: 10.7868/S0015330317050037.
5. Khandy M. T., Kochkin D. V., Tomilova S. V., Galishev B. A., Sukhanova E. S., Klyushin A. G., Ivanov I. M., Nosov A. M. Obtaining and investigation of callus and suspension cell cultures of *Tribulus terrestris* L., a producer of steroidal glycosides // Biotechnology. 2016. Vol. 32. No. 4. P. 21–30.
6. Nosov A. M. Use of cell technologies to industrial production of biologically active compounds of plant origin // Biotechnology. 2010. Vol. 26. No. 5. P. 8–28.
7. Sergeeva L. E., Bronnikova L. I. Cell selection with Ba²⁺ cations for obtaining salt resistant wheat lines // Plant Physiology and genetics. 2017. Vol. 49. No. 2. P. 174–178.
8. Jan N., Qazi H., Ramazan S., John R. Developing stress-tolerant plants through *in vitro* tissue culture: family Brassicaceae In book: Biotechnologies of Crop Improvement. Vol. 1. / Ed. By Gosal S. S., Wani S. H. Springer International Publishing AG, 2018. P. 327–372. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_10.
9. Pashtetskii V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L. G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: Publishing house “Arial”, 2017. 244 p.
10. Niksic H., Kovač-Bešović E., Makarević E., Durić K., Kusturica J., Muratovic S. Antiproliferative, antimicrobial, and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil // Journal of Health Sciences. 2017. Vol. 7. No. 1. P. 35–43. DOI: 10.17532/jhsci.2017.412.
11. Bochkarev N. I., Zelentsov S. V. The current state of taxonomy, morphology and selection of lavender // Oil Crops. 2013. No. 2. P.155–156.
12. Salehi B., Mnayer D., Özçelik B., Altin G., Kasapoğlu K. N., Daskaya-Dikmen C., Sharifi-Rad M., Selamoglu Z., Acharya K., Sen S., Matthews K. R., Fokou P. V. T., Sharopov F., Setzer W. N., Martorell M., Sharifi-Rad J. Plants of the genus *Lavandula*: from farm to pharmacy // Natural Product Communications. 2018. Vol. 13 (10). P. 1385–1402.

13. Soni D. R., Sayyad F. G., Sodhi G. K. Micropropagation studies in *Lavandula angustifolia* // Bioscience, Bioengineering and Biotechnology. 2014. Vol. 1. P. 7–10.
14. Zuzarte M., Dinis A. M., Salgueiro L., Canhoto J. A rapid and efficient protocol for clonal propagation of phenolic-rich *Lavandula multifida* // J. Agricultural Science. 2015. Vol. 7. No. 3. P. 8–17.
15. Mitrofanova I. V., Chirkov S. N., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Chelombit S. V., Zakubanskiy A. V., Rabotyagov V. D., Mitrofanova O. V. Micropropagation of *Lavandula angustifolia* Mill. 'Record' and 'Belyanka' // Acta Hort. 2017. Vol. 1187. P. 37–42. DOI:10.17660/ActaHortic.2017.1187.4.
16. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Agalar H. G., Khawar K. M., Kirimer N. *In vitro* propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* – an economically important source of essential oil // Records of Natural Products. 2019. Vol.13. No 2. P.121–128.
17. Yegorova N. A., Mitrofanova I. V., Brailko V. A., Grebennikova O. A., Paliy A. E., Stavtseva I. V. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-term micropropagation *in vitro* // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66. No. 2. P. 326–334. DOI: 10.1134/S1021443719010060.
18. Xiaojun W., Liang J., Mei L., Minan Z., Haiqing Z., Yaozu X. Bioreactor culture and plant regeneration from cell clusters of the aromatic plant, *Lavandula angustifolia* 'Munstead' // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2007. Vol. 82. No. 5. P.781–785.
19. Tsuru M., Inoue M., Kameoka H. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* D.C.) plants // Sci. Hort. 2001. Vol. 88. No. 4. P. 309–317.
20. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2013. Vol. 31. P.166–174.
21. Yegorova N. A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: callus and morphogenesis induction, use of somaclonal variability // Plant Physiology and Genetics. 2014. Vol. 46. No. 2. P. 108–120.
22. Yegorova N. A., Stavtseva I. V. Development of selective system *in vitro* for obtaining lavender callus lines resistant to low temperature // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. 2017. No. 4 (67). P. 48–51. DOI: 10.21515/1999-1703-67-48-51.
23. Georgiev M., Georgiev V., Penchev P., Antonova D., Pavlov A., Ilieva M., Popov S. Volatile metabolic profiles of cell suspension cultures of *Lavandula vera*, *Nicotiana tabacum* and *Helianthus annuus*, cultivated under different regimes // Eng. Life Sci. 2010. Vol. 10. No. 2. P.148–157. DOI: 10.1002/elsc.200900090.
24. Patel S., Gaur R., Upadhyaya M., Mathur A., Mathur A. K., Bhakuni R. S. *Glycyrrhiza glabra* (Linn.) and *Lavandula officinalis* (L.) cell suspension cultures-based biotransformation of β -artemether // Journal of Natural Medicines. 2011. Vol. 65. No. 3-4. P. 646–650.
25. De Bona C. M., Santos G. D., Biasi L. A. *Lavandula* calli induction, growth curve and cell suspension formation // Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2012. Vol. 7. No. 1. P. 17–23. DOI: 10.5039/agraria.v7i1a1121.
26. Pavlov A. I., Georgiev M. I., Ilieva M. P. Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: effect of dissolved oxygen concentration and agitation // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21. No. 4. P.389–392.
27. Georgiev M., Abrashev R., Krumova E., Demirevska K., Ilieva M., Angelova M. Rosmarinic acid and antioxidant enzyme activities in *Lavandula vera* MM cell suspension culture: a comparative study // Appl Biochem Biotechnol. 2009. Vol. 159. P.415–425. DOI 10.1007/s12010-008-8437-3.
28. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev: Naukova dumka, 1980. 488 p.
29. Ilieva-Stoilova M. P., Pavlov A. I., Kovatcheva-Apostolova E. G. Further research into *Lavandula* species. Cell cultures of *L. vera* and rosmarinic acid production. Lavender. The genus *Lavandula* / Ed. Lis-Balcnin M. London, New York: publ. by Taylor and Francis, 2002. P.214–226.
30. Yegorova N. A. Obtaining of plants-regenerants in callus culture of lavender and their micropropagation *in vitro* (guidelines). Simferopol: IEMP UAAS, 2008. 28 p.
31. Yegorova N. A. Variability of lavender callus culture during long-term passaging *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2017. No. 1 (9). P. 16–27.
32. Ardekani M. R. S., Linley P. A., Harkiss K. J., Mohagheghzadeh A., Gholami A., Mosaddeg M. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* // Iranian J. of Pharmaceutical Sciences. 2007. Vol. 3. No. 2. P. 93–100.

UDC 633.81:57.085.2

Yegorova N. A.

OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR OBTAINING AND CHARACTERISATION OF LAVENDER SUSPENSION CULTURE

Summary. *Narrow-leaved lavender is one of the most common essential oil plants in southern Russia, which is widely used in the perfumery, cosmetics, food industries, and medicine. When developing cell technologies of this species, it is important to choose a suitable biotechnological object and in vitro cultivation regimes. The purpose of this work – optimization of the conditions for obtaining lavender cell suspension culture and its characteristic. The tissues and organs of lavender plants (*Lavandula angustifolia* Mill.) cultivar ‘Stepnaya’ were the material of this research. Callus was obtained from leaf explants and cultured on Murasige and Skoog medium (MS) supplemented with 1.0 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP. To obtain a primary suspension culture, callus tissue was transferred into flasks with a liquid culture medium and cultivated on a shaker. When optimizing conditions for the long-term growth of suspension culture, we studied the effect on its main parameters (density, viability, and aggregation) of the initial suspension density, the culture medium hormonal composition and the duration of cultivation in the growing cycle. The best growth of the suspension was provided by a nutrient medium of the same composition as for the induction of callus (MS with NAA and BAP), the initial density for subculturing the suspension $1.8\text{--}2.0 \times 10^4$ cells/ml and the shaker rotation speed 90 rev./min. The cytophysiological characteristic of the cell population in the suspension growth cycle was given and the duration of the main phases of the growth cycle was determined. During the growing cycle under deep cultivation of lavender, an increase in the suspension density was 22 times. The growth cycle of the suspension culture and the duration of its main phases were shorter than that of callus tissue. The stationary phase of the cell population began on the 14th day of cultivation. At all phases of the growth cycle cell viability reached 69.7–81.2 %. The content of the unicellular fraction varied from 19.8 to 33.4 %; at the stationary phase, it was 30.8 %. The developed regimes of the long-term cultivation of a cell suspension ensured its good growth during 3–4 years. The possibility of using a lavender suspension culture for unicellular cloning has been shown.*

Keywords: *Lavandula angustifolia, cell suspension culture, culture medium, in vitro, aggregation and density of suspension.*

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Yegorova Natalia Alekseevna, Dr. Sc. (Biol.), head of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150 Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 13.01.2020.

Дата принятия к печати – 02.02.2020.