

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *WITHANIA SOMNIFERA* L.

А.А. Алрашиди

аспирант, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)
E-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru

Е.А. Калашникова

д.б.н., профессор, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)
E-mail: kalash0407@mail.ru

Р.Н. Киракосян

к.б.н., кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)
E-mail: mia41291@mail.ru

Исследовано влияние гормонального состава питательной среды (2,4-Д или НУК), а также витаминно-минерального комплекса на получение суспензионной культуры ашваганды (*Withania somnifera* L.) *in vitro*. Установлено, что для быстрого получения суспензионной культуры целесообразно добавлять в состав питательной среды витаминно-минеральный комплекс на фоне ауксинов либо 2,4-Д, либо НУК в концентрации 2 мг/л. Показано, что в этих условиях формируется хорошо пролиферирующая, мелкоагрегированная суспензионная культура, состоящая из жизнеспособных клеток в среднем на 78%. Полученную суспензионную культуру можно в дальнейшем использовать для изучения вторичных метаболитов, в частности витаферина А.

Ключевые слова: ашваганда, каллусная ткань, суспензионная культура, питательная среда, гормоны, ауксины, цитокинины, *in vitro*.

Для цитирования: Алрашиди А.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Получение и характеристика суспензионной культуры клеток *Withania somnifera* L. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(3):32–36.
DOI: 10.29296/25877313-2018-03-06

Природные лекарственные вещества, полученные из растений, в отличие от искусственно созданных препаратов, играют важную роль в системе здравоохранения различных стран мира, а поиск альтернативных путей по производству целевых лекарственных соединений из растений остается актуальным направлением исследований [1].

В настоящее время для сохранения, массового производства и получения необходимых для человека фитопрепаратов из ценных лекарственных растений применяют методы биотехнологии. Среди известных методов наибольшую популярность получил метод культивирования каллусных и суспензионных культур в условиях *in vitro*, который широко применяется для многих ценных лекарственных растений, находящихся, например, на грани исчезновения.

Одним из перспективных растений для изучения в культуре *in vitro* является растение ашваганда (*Withania somnifera*), которое принадлежит к семейству пасленовых (*Solanaceae*) и в диком виде произрастает в сухих частях субтропических районов

Индии, Конго, Южной Африки, Египта, Иордании, Пакистана, Афганистана и т.д., а в Непале осуществляется его плантационное выращивание. В традиционной системе это растение используется в качестве сильного афродизиака, для лечения нервного истощения, памяти, бессонницы, а также проблем с усталостью, заболеваниями кожи и при кашле [2]. Биологически активными веществами *W. somnifera* являются алкалоиды, стероидные соединения, сапонины, глюкозиды, крахмал, восстанавливающий сахар, различные аминокислоты (аспарагиновая кислота, пролин, тирозин, аланин, глицин, глутаминовая кислота, триптофан) и большое количество железа. Кроме того, в корнях этого растения синтезируется свободный витаферин А, обладающий противоопухолевой активностью [3].

В литературе можно найти много сведений о регенерации *W. somnifera* в культуре *in vitro* и очень мало сообщений о каллусной и тем более суспензионной культурах. Например, G. Rani и соавторы сообщают о возможности получения каллуса ашваганды из листьев, сегментов побега, ги-

покотилей и корня при культивировании их на питательной среде МС, содержащей 2,4-Д 2 мг/л и кинетин 0,2 мг/л [4]. В других работах сообщается об индукции каллусной ткани из корневых сегментов, из которой в дальнейшем были получены растения-регенеранты, из побегов и корней которых был выделен витанолид. Также в литературе имеются данные о получении вторичных метаболитов из каллусной ткани *W. somnifera*, характеризующейся различным уровнем ploидности, полученной из сегментов междоузлий [5, 6]. Что касается суспензионной культуры, то такие исследования практически отсутствуют.

Известно, что одним из достоинств суспензионной культуры является ее использование в работах по получению веществ вторичного метаболизма *in vitro*, так как разработанный и предложенный протокол ее получения может быть в дальнейшем использован в промышленных масштабах при выращивании клеток суспензионной культуры в ферментерах [7]. Однако для перехода к практическому применению необходимо на начальном и последующих этапах работы получить хорошо пролиферирующую культуру, характеризующуюся высокой жизнеспособностью, мелкой или средней агрегированностью, высоким индексом роста, при этом клетки должны быть способны синтезировать вещества вторичного метаболизма. Все эти показатели в большей степени зависят от условий культивирования и, в частности, от правильности выбора регуляторов роста, их концентраций и сочетаний [8].

Работы по получению и культивированию суспензионной культуры ашваганды, в основном, проводятся в Индии. Однако эти исследования находятся на стадии экспериментального поиска, а полученные результаты не всегда стабильны.

Ц е л ь р а б о т ы – изучить влияние условий культивирования на индукцию образования суспензионной культуры *W. somnifera in vitro* и дать ей характеристику.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Объектом исследования служила суспензионная культура ашваганды (*W. somnifera*), полученная из каллусной ткани рыхлого типа по методике, приведенной в [9].

Суспензию клеток культивировали на жидкой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), содержащей различные регуляторы роста (2,4-Д или НУК в концентрации 2 мг/л), а также витаминно-минеральный комплекс (ВМК), в состав которого входили: тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, рибофлавин, пантотенат кальция, фолиевая кислота, аскорбиновая кислота, рутин (концентрации веществ запатентованы). Выращивание суспензионной культуры проводили на качалке в условиях постоянного аэрирования, при скорости вращения 100 об/мин. Пересадку суспензионной культуры осуществляли один раз в две недели.

Для определения жизнеспособности клеток суспензионной культуры применяли метод окрашивания. В качестве красителя использовали раствор синьки Эванса, при окрашивании которой мертвые клетки пропускали краситель и окрашивались, а живые клетки оставались прозрачными – неокрашенными. Подсчет клеток проводили в камере Горяева 4-сеточной с применением микроскопа. В камере Горяева также подсчитывали степень агрегированности и плотность посева суспензионной культуры по общепринятым методикам [8].

Для определения основных характеристик суспензионной культуры, таких как индекс роста I , удельная скорость роста в экспоненциальной фазе μ , экономический коэффициент Y , время удвоения τ и продуктивность P , необходимо было определить количество клеток в 1 мл в начале культивирования и в конце пассажа. Полученные значения в дальнейшем использовали в расчетах.

Индекс роста рассчитывали по формуле

$$I = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}, \quad (1)$$

где X_{\max} и X_0 – максимальное и начальное значения количества клеток в 1 мл соответственно.

Удельную скорость роста в экспоненциальной фазе вычисляли по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}, \quad (2)$$

где X_2 и X_1 – количество клеток в 1 мл среды в моменты времени t_2 и t_1 соответственно (рассчитывали для экспоненциальной фазы роста).

Время удвоения определяли по формуле

$$\tau = \frac{\ln 2}{\mu}. \quad (3)$$

Экономический коэффициент вычисляли как

$$Y = \frac{X_{\max} - X_0}{S}, \quad (4)$$

где X_{\max} и X_0 – см. выше; S – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде.

Продуктивность исследуемых культур (максимальное значение) вычисляли следующим образом:

$$P_i = \frac{X_i - X_0}{t_i - t_0}, \quad (5)$$

где X_0 и X_i – количество клеток в 1 мл в начале культивирования и в момент времени t_i соответственно.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием параметрических критериев Стьюдента и Дункана с помощью программы AGROS (версия 2.11), а также стандартных пакетов программы Windows Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что рост суспензионной культуры и ее степень агрегированности зависит от гормонального и минерального состава питательной среды, а также от числа субкультивирований. Экспериментально установлено, что на первом пассаже, независимо от состава питательной среды суспензия состояла из мелких и крупных агрегатов клеток меристемоподобного типа и лишь в 20% случаев – из одиночных, паренхимоподобных клеток, которые имели округлую форму (рис. 1). О формировании суспензионной культуры свидетельствовало образование на стенках сосуда клеточного кольца, которое, как правило, состояло из одиночных клеток и мелких клеточных агрегатов (рис. 2).

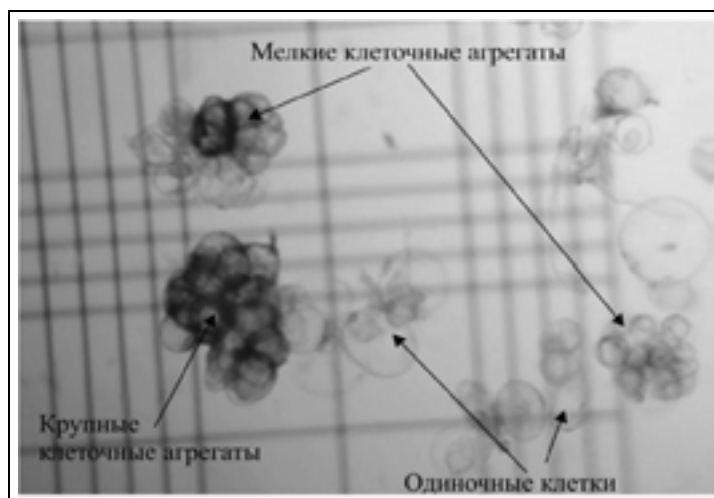


Рис. 1. Суспензионная культура ашваганды на первом пассаже

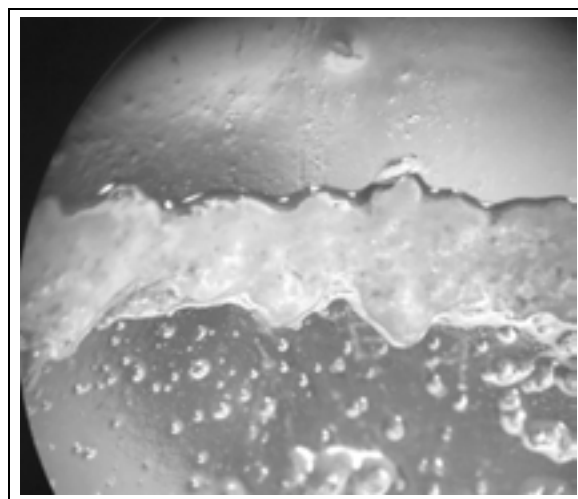


Рис. 2. Клеточное кольцо на стенках сосуда

Однако по мере культивирования суспензия становилась мелкоагрегированной, состоящей уже на 80% из одиночных клеток, которые приобретали вытянутую форму и на 20% – из крупных клеточных агрегатов, состоящих из меристемоподобных клеток. Во всех вариантах суспензионная культура была представлена сильно вакуолизированными клетками (рис. 3).

Анализируя жизнеспособность клеток суспензионной культуры в процессе субкультивирований, можно заключить, что удалось получить стабильно растущую культуру, характеризующуюся высокой жизнеспособностью (в среднем 78%) на протяжении всего времени исследований. Последующее субкультивирование проводили согласно рекомен-

дациям [7, 8] и использовали 10-кратное разбавление, т.е. в 30 мл питательной среды содержалось 3 мл инокулюма, при этом начальная плотность клеточной культуры составляла 450 мг сырой биомассы в 30 мл среды или примерно $20 \cdot 10^5$ кл/мл.

На следующем этапе работы необходимо было установить ростовые характеристики суспензионной культуры, полученной в разных условиях выращивания. Исследования проводили на пятом цикле культивирования. В качестве исследуемых вариантов изучали влияние регуляторов роста (2,4-Д и НУК в концентрации 2 мг/л) и витаминно-минерального комплекса на рост суспензионной культуры *W. somnifera*. Полученные кривые роста по вариантам приведены на рис. 4.

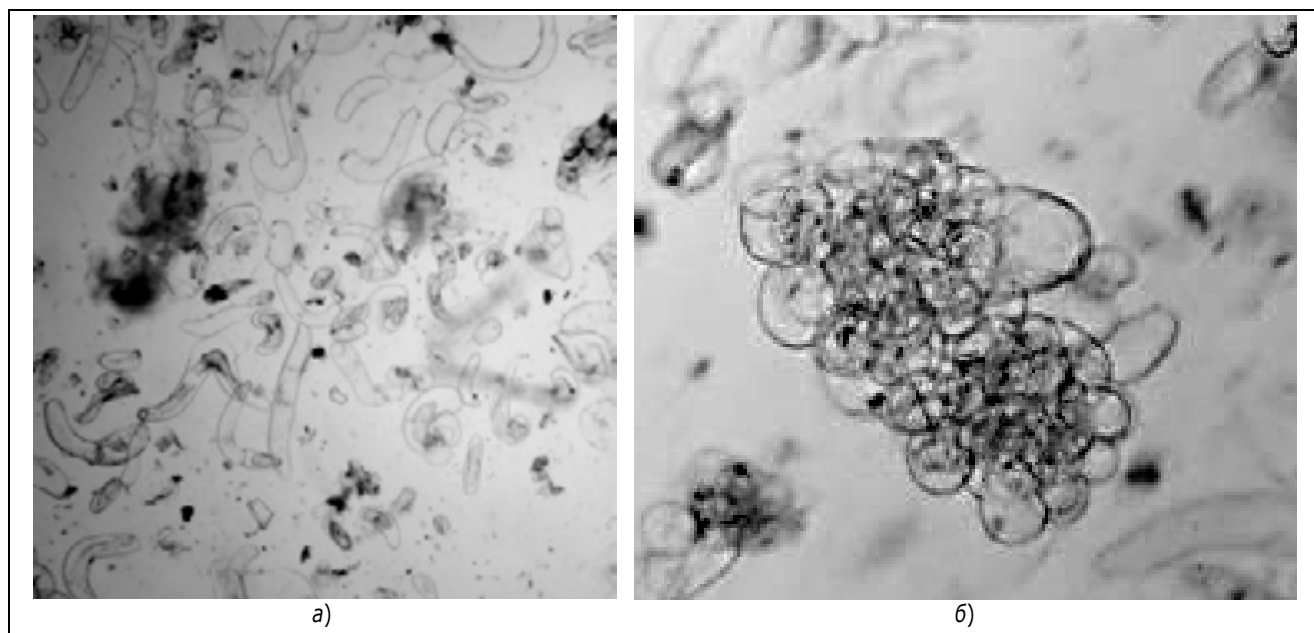


Рис. 3. Суспензионная культура ашваганды на третьем пассаже: а – одиночные клетки; б – единичные клеточные агрегаты

Таблица. Характеристика суспензионной культуры *W. somnifera* по количеству клеток в 1 мл ($\cdot 10^5$) на пятом пассаже

Варианты	Производные параметры роста			
	<i>I</i>	μ , сут ⁻¹	τ , сут	<i>P</i> , кл/мл/сут
2,4-Д	6,77	0,14	4,95	8,71
НУК	6,45	0,14	4,95	9,21
2,4-Д+ВМК	7,55	0,15	4,62	10,78
НУК+ВМК	8,47	0,16	4,33	11,50
ВМК	3,55	0,11	6,30	4,57

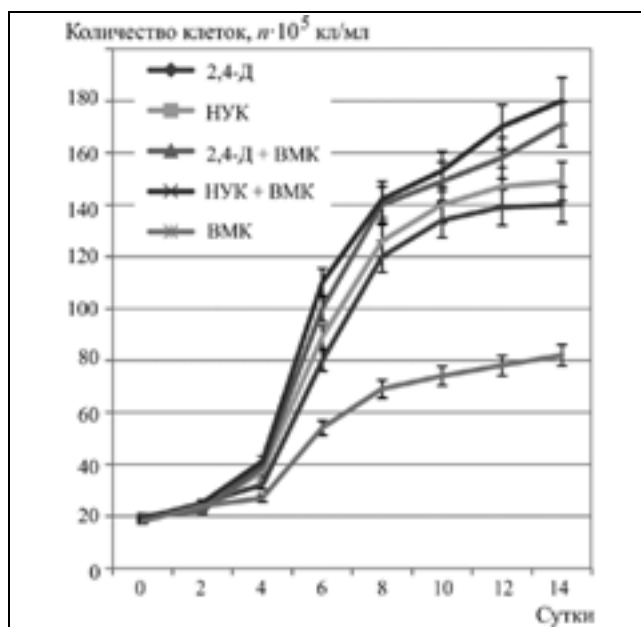


Рис. 4. Ростные кривые суспензионной культуры ашваганды по вариантам

Следует отметить, что гормональный и витаминно-минеральный комплекс питательной среды оказывают существенное влияние на ростовые характеристики суспензии *W. somnifera*. Так, одновременное присутствие в составе питательной среды регуляторов роста и ВМК увеличивает прирост биомассы клеток к концу пассажа в среднем на 120% по сравнению с питательной средой, в которой присутствует только ВМК и на 20% по сравнению с питательной средой, где регуляторы роста находятся самостоятельно. Кроме того, суспензионную культуру в этих вариантах можно охарактеризовать как хорошую по рассчитанным производным ростовых характеристик. Расчет проводили по количеству клеток в 1 мл (таблица).

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных данных, можно заключить, что наличие в среде витаминно-минерального комплекса приводит к получению за один

пассаж большей биомассы клеток, что возможно использовать в дальнейших исследованиях по выращиванию культуры ашваганды в больших объемах питательной среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Hina T., Al, S., Asi M.R. Appraisal of an important Flavonoid, Quercetin, in callus cultures of *Citrullus colocynthis* // International Journal of Agriculture and Biology. 2012. № 14(4). С. 528–532.
- Алрашиди А.А., Соловьев А.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Влияние гормонального состава питательной среды на каллусогенез ашваганды (*Withania somnifera* L.) *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20. № 9. С. 3–8.
- Shukla D.D., Bhattarai N., Pant B. In vitro Mass Propagation of *Withania somnifera* (L.) Dunal // Nepal Journal of Science and Technology. 2010. № 11. С. 101–106.
- Rani G., Virsk G.S., Nogpal A. Callus induction and plantlet regeneration in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *in vitro* cell // Dev. Biol. Plant. 2003. № 39. С. 468–474.
- Suraj R.A., Bijaya P.A. Induction and Proliferation of in vitro Mass of Callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal. // Research in Plant Sciences. 2013. V. 1. № 3. С. 58–61.
- Paudel S., Adhikari S. R., Pant B. Effect of colchicines on production of secondary metabolites from callus of *Withania somnifera* (L.) // Journal of Nepal Biotechnology. 2013. № 3(1). С. 15–18.
- Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // В сб: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. В.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ. 2011. С. 386–403.
- Ханды М.Т. Особенности образования стероидных гликозидов в культурах клеток *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* и *Trigonella foenum-graecum*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2016. 23 с.

Поступила 30 октября 2017 г.

THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SUSPENSION CELL CULTURES OF *WITHANIA SOMNIFERA* L.

© Authors, 2018

A.A. Alrashidi

Postgraduate Student, Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev (Moscow)
E-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru

E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev (Moscow)
E-mail: kalash0407@mail.ru

R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev (Moscow)
E-mail: mia41291@mail.ru

The research aim was to study the influence of a nutrient medium hormonal composition of nutrient medium (2,4-D or NAA) and vitamin-mineral complex for receiving a suspension culture of Ashwaganda (*Withania somnifera* L.) *in vitro*. The suspension culture initiated from friable callus tissue type. It was established experimentally that to obtain a suspension culture quickly it is advisable to add nutrients vitamin-mineral complex on the background of auxin, either 2,4-D or NAA in a concentration of 2 mg/L. Under these conditions, well-formed proliferating, melkoqravijnye suspension culture consisting of viable cells on average by 78%. The obtained suspension culture can be used to study the secondary metabolites and, in particular, withaferin A.

Key words: ashwaganda, callus tissue, suspension culture, nutrient medium, growth regulators, auxins, cytokinins, *in vitro*.

For citation: Alrashidi A.A., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. The preparation and characterization of suspension cell cultures of *Withania somnifera* L. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(3):32–36. DOI: 10.29296/25877313-2018-03-06

REFERENCES

- Hina T., Al, S., Asi M.R. Appraisal of an important Flavonoid, Quercetin, in callus cultures of *Citrullus colocynthis* // International Journal of Agriculture and Biology. 2012. №14(4). С. 528–532.
- Alrashidi A.A., Solov'ev A.A., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. Vliyanie gormonal'nogo sostava pitatel'noj sredy na kallusogenez ashvagandy (*Withania somnifera* L.) *in vitro* // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2017. №9. T.20. S. 3–8.
- Shukla D.D., Bhattarai N., Pant B. In vitro Mass Propagation of *Withania somnifera* (L.) Dunal // Nepal Journal of Science and Technology. 2010. № 11. С. 101–106.
- Rani G., Virsk G.S., Nogpal A. Callus induction and plantlet regeneration in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *in vitro* cell // Dev. Biol. Plant. 2003. № 39. С. 468–474.
- Suraj R.A., Bijaya P.A. Induction and Proliferation of in vitro Mass of Callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal. // Research in Plant Sciences. 2013. V. 1. № 3. С. 58–61.
- Paudel S., Adhikari S. R., Pant B. Effect of colchicines on production of secondary metabolites from callus of *Withania somnifera* (L.) // Journal of Nepal Biotechnology. 2013. №3(1). С.15–18.
- Nosov A.M. Metody ocenki i harakteristiki rosta kul'tur kletok vysshih rastenij // V sb: Molekulyarnogeneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoj biologii rastenij, pod red. Kuznecova V.V., Kuznecova V.V., Romanova G.A.. М.: BINOM. 2011. S. 386–403.
- Handy M.T. Osobennosti obrazovaniya steroidnyh glikozidov v kul'turakh kletok *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* i *Trigonella foenum-graecum* Avtoref. Kand. Biol. nauk. 2016. 23 s.