

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ В БИОРЕАКТОРАХ

**Липский Александр Хемович**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»,  
Россия, г. Ялта  
[al6749@mail.ru](mailto:al6749@mail.ru)*

Разработка методов глубинного выращивания открывает перспективы значительного повышения эффективности клонального микроразмножения растений по сравнению с традиционным поверхностным методом за счет интенсификации ростовых и регенерационных процессов в клетках, а также масштабирования процесса выращивания в биореакторах.

Первый этап таких разработок заключается в получении и изучении проэмбриогенных клеточных линий, обладающих высоким регенерационным потенциалом. Проэмбриогенные клеточные линии, как правило, получают и субкультивируют на агаризованной питательной среде – поверхностный метод выращивания. Переход к глубинному методу выращивания начинается с адаптации и оптимизации ростовых и регенерационных процессов в жидкой питательной среде с использованием колб на качалках и роллерах – исходный этап масштабирования выращивания. Полученные на этом этапе стабилизировавшиеся линии проэмбриогенных культуры клеток и тканей служат инокулюмом для изучения процессов масштабирования в лабораторных биореакторах различных типов. По способу обеспечения газо-массообмена существует два основных конструктивных типа биореакторов - с механическим и пневматическим подводом энергии перемешивания. Выращивание суспензионных культур клеток диоскорей и женьшеня в биореакторах при рекордных скоростях механических мешалок разных типов позволяло получать наивысшую продуктивность процесса при высоких концентрациях биомассы для получения ценных продуктов вторичного метаболизма. Однако попытка применения биореактора с механическими мешалками для выращивания культуры почек гладиолуса оказалась безуспешной. Простейшие биореакторы пневматического типа – конические барботажные имеют меньший массообменный потенциал по сравнению с биореакторами с механическими мешалками. Этот тип биореакторов может быть успешно использован в исследованиях с суспензионными культурами клеток при малых концентрациях биомассы и, особенно в работах с проэмбриогенными линиями культур клеток с различным уровнем агрегированности.

Возможность масштабирования выращивания культуры почек гладиолуса в конических барботажных биореакторах исследовалась нами в Отделе, возглавлявшемся чл.-корр. АН СССР Р. Г. Бутенко, Института физиологии растений РАН, им. К. А. Тимирязева, Москва. Изучали два режима выращивания – периодического и закрытого типа. Продемонстрирована возможность двукратного увеличения продуктивности микролуковиц при использовании биореактора по сравнению с аналогичным процессом выращивания в колбах на качалке. Величина агрегатов культуры почек в конце цикла выращивания в биореакторах достигала 15–0 мм.

Масштабирование выращивания проэмбриогенных линий культур клеток винограда с низким 1–2 мм и высоким 2–5 мм уровнями диаметров агрегатов также было успешно осуществлено в конических барботажных биореакторах. Эти работы были выполнены нами в лаборатории д-ра А. Перла, Центр с.-х исследований Волкани, Бейт Даган, Израиль. Культивирование проводили в отъемно-доливном режиме в течение шести месяцев. Было показано, что изученные линии культур клеток отличаются уровнем роста и сохранением эмбриогенного потенциала при долговременном получении эмбриогенного материала в биореакторах.

---

*Ключевые слова:* клональное микроразмножение, глубинное выращивание, лабораторные биореакторы, масштабирование выращивания, агрегированность культивируемых объектов.

---

## ESTABLISHMENT OF PLANT CLONAL MICROPROPAGATION METHOD IN BIOREACTORS

**Lipsky Alexander Khemovich**

*Federal State Funded Institution of Science "The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS", Yalta, Russian Federation*  
[al6749@mail.ru](mailto:al6749@mail.ru)

The development of submerged culture methods opens up prospects for a significant increase in the efficiency of plant clonal micropropagation compared to the traditional surface method due to intensification of growth and regeneration processes in cells, as well as scale-up of the growing process in bioreactors.

The first stage of such developments is to obtain and study proembryogenic cell lines with a high regenerative potential. Proembryogenic cell lines are usually obtained and subcultured on agar medium, a surface culture method. The transition to the submerged cultivation method begins with the adaptation and optimization of growth and regeneration processes in a liquid nutrient medium using shake flasks and rollers – the initial stage of scaling up of growing. The stabilized lines of proembryogenic cell and tissue cultures obtained at this stage serve as an inoculum for studying scaling up processes in laboratory bioreactors of various types. According to the method of ensuring gas-mass exchange, two main constructive types of bioreactors exist – mechanical and pneumatic supply of agitation energy. Growing suspension cultures of dioscorea and ginseng cells in bioreactors at record speeds of mechanical stirrers of various types made it possible to obtain the highest productivity of the process at high concentrations of biomass to obtain valuable products of secondary metabolism. However, an attempt to use a bioreactor with mechanical agitators to grow gladiolus buds cultures was unsuccessful. The simplest bioreactors of the pneumatic type - conical bubble ones - have a lower mass exchange potential compared to bioreactors with mechanical stirrers. This type of bioreactors can be successfully used in investigations with cell suspension cultures at low biomass concentrations and, especially, in studies with proembryogenic cell culture lines with different levels of aggregation.

The possibility of scaling up of cultivation of gladiolus bud cultures in conical bubble bioreactors was investigated by us in the Department, headed by Prof. R.G. Butenko, Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow. Two regimes of cultivation were studied - periodic and closed type. The possibility of a two-fold increase in the productivity of microbulbs using the bioreactor compared to a similar process of growing in shake flasks has been demonstrated. The size of bud culture aggregates at the end of the growing cycle in the bioreactors reached 15÷20 mm.

Scaling up of cultivations of proembryogenic grape cell culture lines with low 1÷2 mm and high 2÷5 mm levels of aggregate diameters were also successfully carried out in conical bubble bioreactors. These works were carried out by us in the Laboratory of Dr. A. Perl at The Volcani Center, ARO, Beit Dagan, Israel. Cultivation was carried out in a draw-fill regime for six months. It was shown that the studied cell culture lines differ in the level of growth and preservation of embryogenic potential during the long-term production of embryogenic material in bioreactors.

*Keywords:* clonal micropropagation, submerged cultivation, laboratory bioreactors, scaling up of cultivation, aggregation of cultivated objects.