

УДК 582.998.2: [581.143.6: 581.17]

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ IN VITRO РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*SILYBUM MARIANUM* L.) БЕЛОРУССКОЙ И ВЕНГЕРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

О.В. КОВЗУНОВА, В.Н. РЕШЕТНИКОВ

Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»  
220012 Беларусь, Минск, ул. Сурганова, 2в  
e-mail: olga-kopa@mail.ru

Определен наилучший способ стерилизации семян расторопши пятнистой, для которого характерно максимальное количество жизнеспособных и стерильных семян (98—99 %). Выявлена зависимость индекса роста от комбинации фитогормонов в культуральной среде. Для получения каллюсной ткани расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции вне зависимости от происхождения эксплантата оптимальной является среда на основе среды Мурасиге—Скуга, содержащая 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,4 мг/л кинетина.

**Ключевые слова:** *Silybum marianum* L., культура in vitro, стерилизация, каллюсогенез, фитогормоны, индекс роста.

Высшие растения являются источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. На сегодня активно используются более 350 видов лекарственных растений, из которых около 80 выращиваются специально. Особое значение приобретают исследования по созданию эффективных технологий в производстве фитохимических лекарственных средств с целью комплексного использования лекарственного сырья, достижения более высоких выходов, расширения спектра извлекаемых биологически активных веществ (БАВ) и ресурсосбережения [1—3].

Особый интерес к расторопше пятнистой возник после проведения серии работ зарубежными исследователями, в частности, немецкими учеными [4, 5], которые в середине 1960-х годов выделили из плодов оригинальные биологически активные соединения, названные силимариновым комплексом [6] (СМ), составляющие 1,5—3,8 % массы сухого сырья [7, 8]. Силимарин представляет собой сложную смесь, состоящую из нескольких изомеров флавонолигнанов с эмпирической формулой  $C_{25}H_{22}O_{10}$ . В семенах расторопши силимарин содержится в большем количестве, чем в других частях растения [9]. Кроме того, в расторопше выявлены апигенин, таксифолин, силибонол, смолы, слизь, биогенные амины и другие соединения [10]. К на-

стоящему времени в расторопше пятнистой обнаружено 101 БАВ и 13 микроэлементов [11, 12]. Значительный фармакологический интерес к СМ связан с его высоким антигепатотоксическим, гепатопротекторным [13] и антихолестерологическим действием [14]. Использование расторопши пятнистой в качестве источника сырья в химико-фармацевтической промышленности инициировало поиск наиболее перспективных ее сортов. Отличие красно- и белоцветковой рас расторопши проявляется в основном разным количественным соотношением в СМ двух из шести его главных компонентов — флаволигнанов силибина и силидианина [15].

Проблему изыскания путей компенсации дефицита лекарственного сырья можно решить, используя биомассу лекарственных растений, получаемую биотехнологическим способом с направленным биосинтезом целевых веществ. На сегодня биотехнологические подходы предоставляют альтернативу распространенному способу получения растительных лекарственных соединений в виде экстрактов из растительного сырья, выращенного на полях. Культуры клеток, тканей, органов и растений *in vitro* можно использовать как «фабрики» по производству БАВ [3]. Уровни накопления ценных вторичных метаболитов в культурах *in vitro* как правило ниже, чем в исходном растении. Усиления продуцирования вторичных метаболитов добиваются в результате усовершенствования исходных сортов растений, отбора высокопродуктивных клеточных линий и направленной регуляции биосинтеза ценных соединений в клеточных культурах растений. Количество синтезируемого СМ в клеточных культурах *S. marianum* зависит от принадлежности к расе, сорту и выбора эксплантата, взятого для инициации [16].

Для получения клеточной культуры необходимо разработать схему оптимального метода стерилизации семян с целью получения стерильного материала для последующей инициации каллюсогенеза. Также необходимо подобрать концентрацию и состав фитогормональной среды, обеспечивающей максимальные ростовые характеристики клеточной линии.

В связи с вышеизложенным целью работы был подбор условий введения в культуру *in vitro* *Silybum marianum* L. красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции, белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции и получение каллюсной культуры различного происхождения с максимальными значениями индекса роста.

### Методика

Объектами исследования *in vitro* были семена *Silybum marianum* L. красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции. Исследования проводились классическими биотехнологическими методами.

На первом этапе работы подбирали стерилизующие агенты для введения в культуру семян красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортообразца венгерской селекции для получения стерильных *in vitro* растений. С этой целью оценивали влияние различных комбинаций стерилизующих веществ на жизнеспособность

семян по критерию всхожести. Стерилизацию семян осуществляли промыванием с хозяйственным мылом и замачиванием в следующих стерилизующих реагентах: 1) в 0,4 %-м растворе контактного фунгицида дитана в течение 40 мин и 10 %-м растворе гипохлорита кальция в течение 20 мин; 2) в 0,1 %-м растворе нитрата серебра в течение 25 мин; 3) в 0,1 %-м растворе диацида в течение 25 мин; 4) в 7 %-м растворе гипохлорита кальция в течение 25 мин. После выдерживания семян в стерилизующих растворах их трижды промывали автоклавированной водой. Больше всего жизнеспособных и стерильных семян получено при использовании хозяйственного мыла, дитана и 10 %-го раствора гипохлорита кальция [17]. При данном способе стерилизации жизнеспособность семян *S. marianum* красноцветкового сорта составляла 51,7 %, их стерильность — 98,2 %, белоцветкового сортаобразца — 83,5 и 98,8 % соответственно (рис. 1).

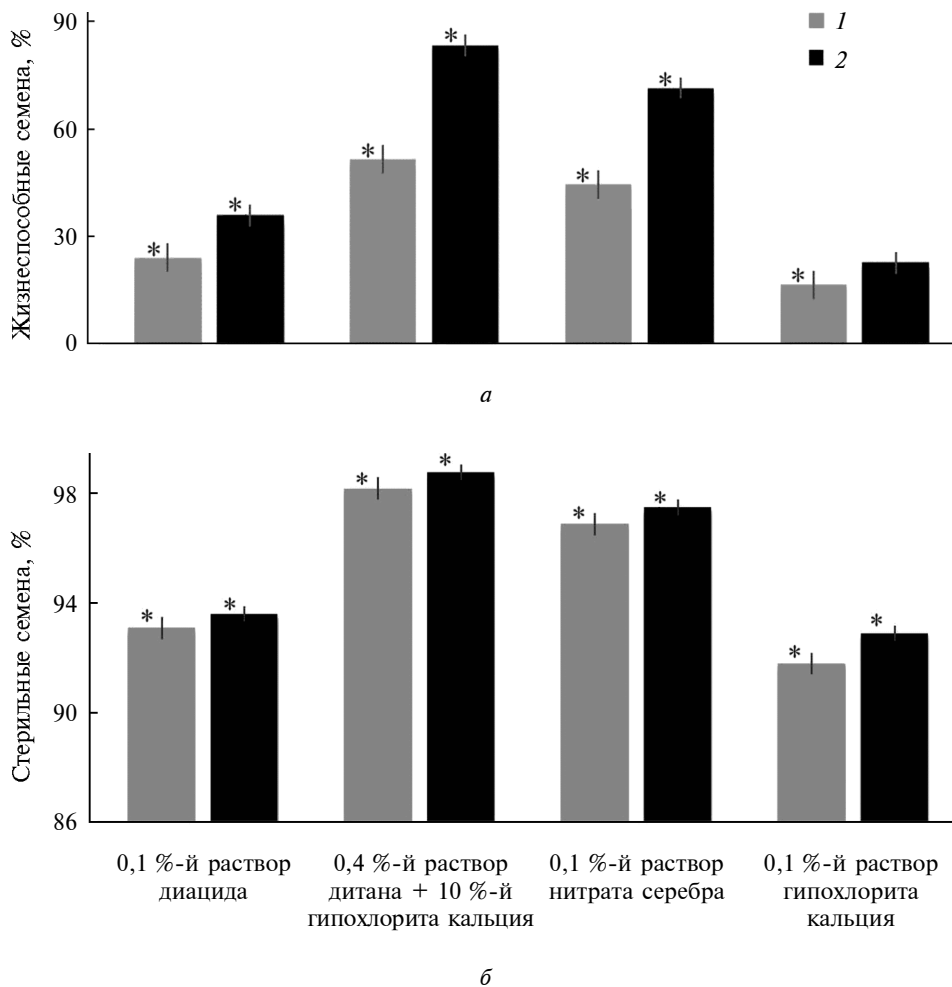


Рис. 1. Жизнеспособность (а) и стерильность (б) семян *S. marianum* красноцветкового сорта Золушка (1) и белоцветкового сортаобразца Sibilla (2) в зависимости от стерилизующего агента. Здесь и на рис. 2: \* — различия достоверны по сравнению с другими вариантами при  $p \leq 0,05$

При использовании в качестве стерилизующего агента 7 %-го раствора гипохлорита кальция отмечен наиболее низкий выход стерильных семян (91,8 и 92,9 % для красно- и белоцветковой рас расторопши соответственно) по сравнению с другими использованными реагентами. Количество жизнеспособных семян при стерилизации в 0,1 %-м растворе диацета у красноцветкового сорта составило 24,1 %, количество стерильных семян — 93,1 %, у белоцветкового сортаобразца — 35,9 и 93,6 % соответственно. При использовании 0,1 %-го раствора нитрата серебра количество стерильных семян у растений белоцветковой расы составило 97,5 %, а их жизнеспособность — 71,6 %. Подобная ситуация наблюдалась и для семян красноцветковой расы: жизнеспособность 44,6 %, стерильность — 96,9 % [17]. Таким образом, согласно полученным данным по стерильности и выходу жизнеспособных семян расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас, наиболее подходящим способом стерилизации является использование хозяйственного мыла, 0,4 %-го раствора дитана и 10 %-го раствора гипохлорита кальция. На основании полученных данных составлен лабораторный регламент введения в культуру *in vitro* *S. marianum*.

Семена проращивали на модифицированной питательной среде Мурасиге—Скуга (МС) с добавлением 0,05 % активированного угля, интенсивность освещения 3000 лк с фотопериодом 16 ч день/8 ч ночь при температуре 25 °С для получения стерильных *in vitro* растений, необходимых для инициации каллюсогенеза.

Дальнейшее развитие растений в условиях *in vitro* было одинаковым: к 7-м суткам культивирования в обоих вариантах расторопши пятнистой одновременно с появлением корней начиналось развитие семядольных листьев, к 17-м — была сформирована одна пара настоящих листьев, вторая находилась на начальном этапе развития [17]. Следует отметить, что габитус растений белоцветковой расы расторопши превышал таковой красноцветковых растений, особенно размер семядольных листьев. В возрасте 17 сут сеянцы отделяли от семян и пересаживали на свежую среду МС в качестве источника стерильных эксплантатов для каллюсогенеза. Приблизительно через каждые 3–4 недели растения пересаживали на свежую среду МС. Культивирование проводили на свету с фотопериодом 16 ч день/8 ч ночь при температуре 25 °С. Для получения каллюсной биомассы расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортаобразца Sibilla использовали корневые, стеблевые, листовые и семядольно-листовые эксплантаты-сегменты размером 4 × 4 мм, взятые с 17-суточных сеянцев. Эксплантаты помещали на среды шести вариантов на основе МС, различающихся содержанием ауксинов и цитокининов, а также концентрацией фитогормонов.

Варианты сред, использованные для индукции каллюсогенеза различных эксплантатов *S. marianum* красно- и белоцветковой рас, были следующими:

Среда	Сочетание фитогормонов
1	0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л кинетина
2	2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП
3	1 мг/л 2,4-Д + 0,4 мг/л кинетина

Среда	Сочетание фитогормонов
4	2 мг/л ИУК + 2 мг/л кинетина
5	1 мг/л ИУК + 0,5 мг/л кинетина
6	0,5 мг/л ИУК + 0,1 мг/л кинетина

### Результаты и обсуждение

Варианты сред, использованные для индукции каллюсогенеза, были выбраны на основе литературных данных [18, 19]. Влияние фитогормонов на рост и развитие каллюсных тканей оценивали с помощью индекса роста [20] (рис. 2).

Установлено, что индекс роста всех эксплантатов зависел от комбинации фитогормонов в культуральной среде.

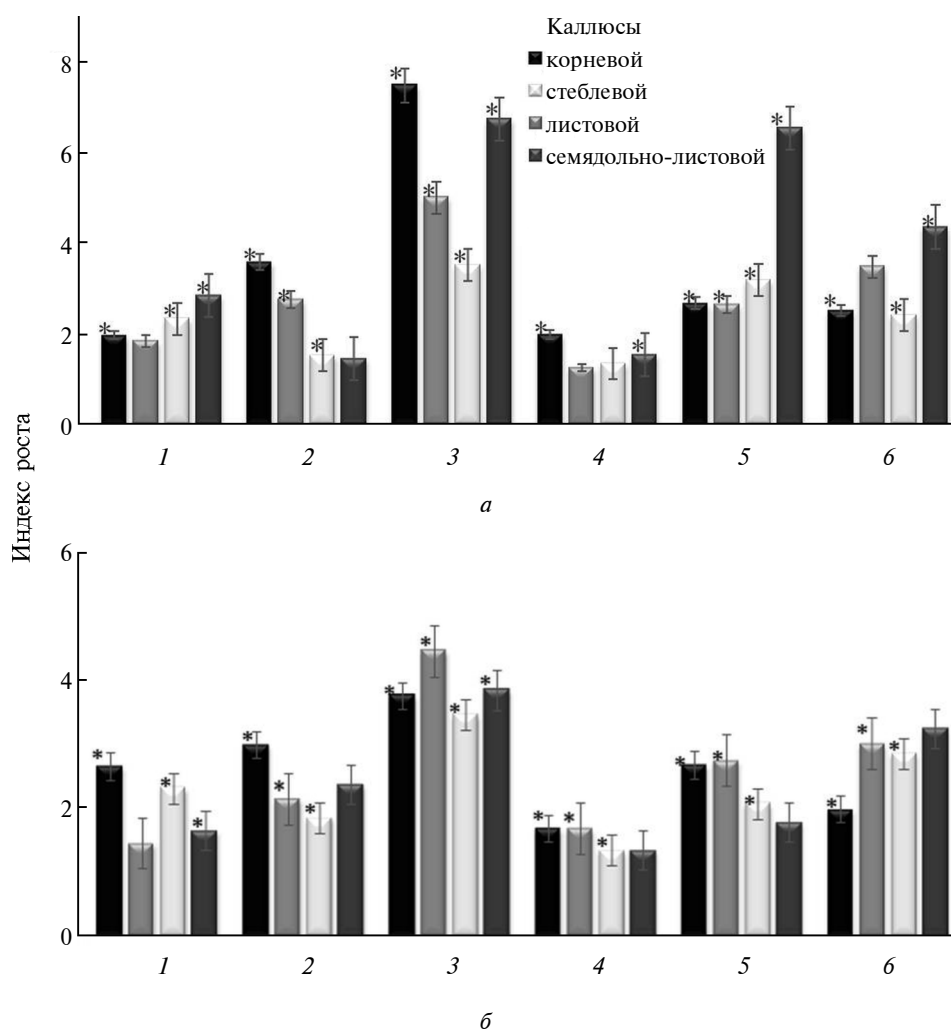


Рис. 2. Индексы роста каллюса *S. marianum* белоцветкового сортобразца Sibilla (а) и красноцветкового сорта Золушка (б) в зависимости от фитогормонального состава среды культивирования

При культивировании эксплантатов белоцветкового сортообразца на средах 3, 5, 6 и 1 данные концентрации фитогормонов вызывали достоверное увеличение индекса роста (см. рис. 2). Между индексами роста листовых и семядольно-листных эксплантатов, выращенных на средах 1 и 2, различий не было, и добавление в среду 2,4-Д в концентрации 1 мг/л приводило к максимальному увеличению индекса роста, добавление в культуральную среду БАП в низкой концентрации (0,1 мг/л) и сочетание фитогормонов в среде 4 не вызывало значимых изменений индекса роста листовых, стеблевых и семядольно-листных эксплантатов по сравнению с другими средами культивирования. Культивирование каллюсной ткани расторопши красноцветкового сорта Золушка на средах 3 и 6 вызывало резкое увеличение индекса роста по сравнению с другими вариантами сред. Наибольшее значение данного параметра достигалось на среде 3 (1 мг/л 2,4-Д + 0,4 мг/л кинетина), что совпадало с литературными данными [19]. Наименьшее увеличение индекса роста расторопши как красно-, так и белоцветковой рас наблюдалось на среде, содержащей 2 мг/л ИУК и 0,2 мг/л кинетина, что дало нам основание считать данную среду наименее благоприятной для инициации каллюсогенеза. Оптимальной для получения каллюсной ткани расторопши пятнистой вне зависимости от происхождения и принадлежности к расе является среда на основе МС, содержащая 1 мг/л 2,4-Д и 0,4 мг/л кинетина.

Следует подчеркнуть, что инициация каллюсогенеза на корневых и семядольно-листных эксплантатах красно- и белоцветковой рас *S. marianum* наступала в разные сроки. Очаги каллюсных клеток на эксплантатах белоцветкового сортообразца появились на 11-е сутки культивирования, у красноцветкового сорта — лишь на 19-е. Нами было отмечено, что на средах с добавлением ИУК наблюдался частичный ризогенез как на листовых, так и на стеблевых эксплантатах. Каллюс на средах с ИУК был более рыхлым и светлым, чем на средах с добавлением 2,4-Д. Это объясняется тем, что содержание в культуральной среде 2,4-Д способствует накоплению различных вторичных метаболитов, характерных для данного вида. К 18-м суткам у всех корневых и семядольно-листных эксплантатов белоцветковой расторопши был полностью сформирован краевой каллюс, в то время как у красноцветковой расы эта стадия каллюсогенеза наблюдалась на 29-е сутки культивирования. Вероятно, что эксплантаты от белоцветковых растений венгерской селекции обладают гормональным статусом, способствующим более активному каллюсогенезу, чем красноцветковых.

На основе полученных данных разработан лабораторный регламент на инициацию каллюсообразования культуры *S. marianum* красно- и белоцветковой рас.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана схема введения в культуру *in vitro* семян расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас. Установлено, что наилучшим способом их стерилизации является промывание с хозяйственным мылом и замачивание в 0,4 %-м растворе контактного фунгицида ди-

тана в течение 40 мин и 10 %-м растворе гипохлорита кальция в течение 20 мин с последующим трехкратным промыванием автоклавированной водой. При данном способе стерилизации жизнеспособность семян *S. marianum* красноцветкового сорта Золушка составила 51,7 %, их стерильность — 98,2 %, для белоцветкового сортообразца Sibilla — соответственно 83,5 и 98,8 %. Впервые получены каллюсные культуры корневого, стеблевого, листового и семядольно-листового происхождения расторопши пятнистой красноцветкового сорта Золушка и белоцветкового сортообразца Sibilla венгерской селекции. Установлено, что для индукции каллюсообразования на четырех видах эксплантатов расторопши пятнистой красно- и белоцветковой рас оптимальной является среда МС, включающая 1 мг/л 2,4-Д и 0,4 мг/л кинетина.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 2002. **1**, N 1. P. 13–25.
2. Zschocke S., Rabe T., Taylor J.L., Jager A.K., van Staden J. Plant part substitution — a way to conserve endangered medicinal plants? *J. of Ethnopharmacology*. 2000. **71**, N 1/2. P. 281–292.
3. Rao S.R., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Advances*. 2002. **20**, N 2. P. 101–153.
4. Hahn G., Lehmann H.D., Kurten M., Uebel H., Vogel G. On the pharmacology and toxicology of silymarin, an antihepatotoxic active principle from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneimittel-Forschung*. 1968. **18**, N 6. S. 698–704.
5. Куркин В.А. Расторопша пятнистая — источник лекарственных средств (обзор). *Хим.-фармацевт. журн.* 2003. **37**, № 4. С. 27–41.
6. Куркин В.А., Запесочная Г.Г. Флаволигнаны и другие природные лигнаноиды. Проблемы структурного анализа. *Химия природ. соединений*. 1987. № 1. С. 11–34.
7. Wellington K., Adis B.J. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*. 2001. **15**, N 7. P. 465–489.
8. Fructus silybi mariae [Electronic resource]. WHO Monographs on selected medicinal plants: [in 4 vol.] / WHO. Geneva, 2004. 2. Mode of access: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/>. Date of access: 16.10.2017.
9. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver diseases. Pt. 1. *Alternative Med. Rev.* 1998. **3**, N 6. P. 410–421.
10. Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. Stuttgart; Boca Raton: CRC Press, 2004. 704 p.
11. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases [Electronic resource] / US Dep. of Agr., Nat. Agr. Libr. 2017. Mode of access: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>. Date of access: 13.10.2017.
12. Pedersen M. Nutritional herbology: including the nutritional profiles of 106 commonly used herbs and foods [S. l.]: Pedersen Pub., 1987. 377 p.
13. Valenzuela A., Guerra R., Videla L.A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med.* 1986. **52**, iss. 6. P. 438–440.
14. Krecman V., Skottova N., Walterova D., Ulrichova J., Simanek V. Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.* 1998. **64**, iss. 2. P. 138–142.
15. Чубарова А.С., Капустин М.А., Спиридович Е.В., Курченко В.П. Содержание флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) различных хеморас. *Вестн. фармаци.* 2012. № 4. С. 28–31.
16. Verpoorte R., Choi Y.H., Kim H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.* 2007. **6**, N 1. P. 3–14.

17. Копач О.В., Кузовкова А.А., Решетников В.Н. Физиолого-биохимические особенности *Silybum marianum* L. красно- и белоцветковой рас при введении в культуру in vitro и каллусогенезе. *Клеточная биология и биотехнология растений*. Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 13—15 февр. 2013). Минск, 2013. С. 189.
18. Sanchez-Sampedro M.A., Pelaez R., Corchete P. An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Carbohydrate Polymers*. 2008. **71**, N 4. P. 634—639.
19. Firouzi A., Mohammadi S.A., Khosrowchahli M., Movafeghi A., Hasanloo T. Enhancement of silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn by elicitation and precursor feeding. *J. of Herbs, Spices and Med. Plants*. 2013. **19**, N 3. P. 262—274.
20. Кузовкина И.Н., Чернышева Т.П., Альтерман И.Е. Характеристика штамма каллусной ткани руты душистой (*Ruta graveolens*), продуцирующей рутакридон. *Физиология растений*. 1979. **26**. № 3. С. 492—499.

Получено 17.09.2018

#### REFERENCES

1. Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.*, 1, No. 1, pp. 13-25.
2. Zschocke, S., Rabe, T., Taylor, J.L., Jager, A.K. & van Staden, J.(2002). Plant part substitution — a way to conserve endangered medicinal plants? *J. of Ethnopharmacology*, 71, No. 1/2, pp. 281-292.
3. Rao, S.R. & Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Advances*, 20, No. 2, pp. 101-153.
4. Hahn, G., Lehmann, H.D., Kurten, M., Uebel, H. & Vogel, G. (1968). On the pharmacology and toxicology of silymarin, an antihepatotoxic active principle from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneimittel-Forschung*, 18, No. 6, ss. 698-704.
5. Kurkin, V.A. (2003). Milk thistle — a source of medicines (review). *Chemist-pharmacist. Journal*, Pt. 37, No. 4, pp. 27-41.
6. Kurkin, V.A. & Zapesochnaya, G.G. (1987). Flavolignans and other natural lignoids. Problems of structural analysis. *Chemistry of Natural compounds*, No. 1, pp. 11-34.
7. Wellington, K. & Adis, B.J. (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, 15, No. 7, pp. 465-489.
8. Fructus silybi mariae [Electronic resource] (2004). 2. Mode of access: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/>. Date of access: 16.10.2017.
9. Luper, S. (1998). A review of plants used in the treatment of liver diseases. Pt. 1 *Alternative Med. Rev.*, 3, No. 6, pp. 410-421.
10. Wichtl, M. (2004). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. Stuttgart; Boca Raton: CRC Press.
11. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases [Electronic resource] (2017). US Dep. of Agr., Nat. Agr. Libr. Mode of access: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>. Date of access: 13.10.2017.
12. Pedersen, M. (1987). Nutritional herbology: including the nutritional profiles of 106 commonly used herbs and foods. [S. 1.]: Pedersen Pub.
13. Valenzuela, A., Guerra, R. & Videla, L.A. (1986). Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Med.*, 52, iss. 6, pp. 438-440.
14. Krecman, V., Skottova, N., Walterova, D., Ulrichova, J. & Simanek, V. (1998). Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.*, 64, iss. 2, pp. 138-142.
15. Chubarova, A.S., Kapustin, M.A., Spiridovich, E.V. & Kurchenko, V.P. (2012). The content of flavolignans in the fruits of thistle *Silybum marianum* (L.) of various chemoraces. *Vestn. pharmacy*, No. 4, pp. 28-31.
16. Verpoorte, R., Choi, Y.H. & Kim, H.K. (2007). NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.*, 6, No. 1, pp. 3-14.



17. Kopych, O.V., Kuzovkova, A.A. & Reshetnikov, V.N. (2013). Physiological and biochemical features of *Silybum marianum* L. of red and white flowering races when introduced into in vitro culture and callusogenesis. Cell biology and plant biotechnology: theses. Intern. scientific-practical. Conf., Minsk, February 13-15, 2013 / The Byelorussian state. un-t [and others; Ed. advice: V. V. Demidchik and others]. Minsk.
18. Sanchez-Sampedro, M.A., Pelaez, R. & Corchete, P. (2018). An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Carbohydrate Polymers, 71, No. 4, pp. 634-639.
19. Firouzi, A., Mohammadi, S.A., Khosrowchahli, M., Movafeghi, A. & Hasanloo, T. (2013). Enhancement of silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn by elicitation and precursor feeding. J. of Herbs, Spices and Med. Plants, 19, No. 3, pp. 262-274.
20. Kuzovkina, I.N., Chernysheva, T.P. & Alterman, I.E. (1979). Characteristics of the strain of callus tissue of *Ruta Graveolens* producing rutacridone. Plant physiology, 26, No. 3, pp. 492-499.

#### КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ (*SILYBUM MARIANUM* L.) БІЛОРУСЬКОЇ Й УГОРСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

*О.В. Ковзунова, В.Н. Решетников*

Державна наукова установа «Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі», Мінськ

Визначено найліпший спосіб стерилізації насіння розторопші плямистої, для якого характерна максимальна кількість життєздатного і стерильного насіння (98–99 %). Виявлено залежність індексу росту від комбінації фітогормонів у культуральному середовищі. Для отримання калусної тканини розторопші плямистої червоноквіткового сорту Золушка білоруської селекції і білоквіткового сортозразка Sibilla угорської селекції незалежно від походження експлантатів оптимальним є середовище на основі середовища Мурасиге—Скуга, що містить 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти і 0,4 мг/л кінетину.

*Ключові слова:* *Silybum marianum* L., розторопша, культура in vitro, стерилізація, калусогенез, фітогормони, індекс росту.

#### IN VITRO CULTIVATION OF *SILYBUM MARIANUM* L. BELARUSIAN AND HUNGARIAN BREEDING

*O.V. Kovzunova, V.N. Reshetnikov*

State Scientific Institution «Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus»

2v Surganova St., Minsk, 220012, Belarus

*e-mail:* [olga-kopa@mail.ru](mailto:olga-kopa@mail.ru)

The best way to sterilize the seeds of the spotted milk thistle, which is characterized by the maximum percentage of viable and sterile seeds (98–99 %) was determined. The dependence of the growth index on the combination of phytohormones in the culture medium was revealed. The optimum medium for obtaining callus tissue of spotted thistle red-flower variety Cinderella of the Belarusian breeding and the white-flower variety Sibilla of Hungarian breeding regardless of the origin of the explant, is the Murashige—Skoog medium containing 1 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.4 mg/l of kinetin.

*Key words:* *Silybum marianum* L., in vitro culture, sterilization, callusogenesis, phytohormones, growth index.