

# ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ (*RHODIOLA ROSEA* L.)

## Т.А. Савина

к.б.н., зав. отделом биотехнологии,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: savina-tatyana57@yandex.ru

## С.Б. Мясникова

науч. сотрудник, отдел биотехнологии,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: vilarnii@mail.ru

## П.С. Савин

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел биотехнологии,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: savin-pavel@list.ru

Изучено воздействие группы макроэлементов на ростовые и биосинтетические свойства суспензионной культуры *Rhodiola rosea* L. Выявлено, что соотношение азота и калия в концентрациях 60 и 40% соответственно обеспечивало достаточно активное нарастание клеточной массы суспензионной культуры *Rhodiola rosea* L. и высокий выход суммы фенилпропаноидов. Установлен оптимальный баланс пяти компонентов макросолей: азота, калия, магния, фосфора, кальция. Углеводы сахароза и глюкоза в равной степени поддерживали высокий синтез в ткани суммы фенилпропаноидов и высокий уровень нарастания биомассы.

**Ключевые слова:** суспензионная культура, минеральные соли, углеводы, фенилпропаноиды.

**Для цитирования:** Савина Т.А., Мясникова С.Б., Савин П.С. Влияние состава питательной среды на ростовые и биосинтетические показатели суспензионной культуры родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(8):9–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-08-02>

Культура клеток растений рассматривается как потенциальное средство производства полезных биологически активных веществ для фармацевтической промышленности [1]. Применение технологии выращивания клеточных культур может помочь избежать ряд проблем, возникающих при использовании нативного растения, такие как влияние факторов окружающей среды (засуха, наводнения и т.д.), болезни, не поддающиеся контролю, различия в качестве урожая, потери при хранении и обработке [2]. Дополнительные преимущества этого метода заключаются в том, что это контролируемое производство, и масштабное производство биомассы может быть организовано в любом месте, в любое время года [3, 4].

Таким образом, получение полезных и ценных вторичных метаболитов биотехнологическим способом достаточно актуально.

Тем не менее, несмотря на изложенные выше преимущества, существует множество проблем, которые необходимо решить, прежде чем данная технология может быть принята для широкомасштаб-

ного производства полезных растительных вторичных метаболитов. Эти проблемы касаются низкого выхода целевых продуктов, нестабильности клеточных линий [1, 3, 5]. Поэтому интенсификация процессов роста клеточных культур и биосинтеза ими биологически активных веществ является основным направлением исследований при разработке биотехнологии производства целевого продукта.

Одним из подходов к решению данной проблемы может быть изучение экзогенного воздействия факторов условий выращивания, в частности состава питательной среды, на продуктивность растительных клеточных культур.

Цель исследования – изучение воздействия на ростовые и биосинтетические свойства суспензионной культуры *Rhodiola rosea* L. группы макроэлементов, входящих в состав питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга в форме солей ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и углеводного компонента. Необходимо отметить, что данные компоненты являются макросоставляющими питательного субстрата.

В проведенных ранее исследованиях для выращивания биомассы *R. rosea* L. и синтеза суммы фенилпропаноидов были установлены оптимальная сумма пяти макроэлементов (фосфор, калий, магний, азот, кальций) и соотношение трех из них (фосфор, кальций, магний) [6]. В связи с этим в дальнейших исследованиях ставились задачи:

изучить влияние на рост суспензионной культуры *R. rosea* L. и синтеза суммы фенилпропаноидов двух элементов минерального питания – азота и калия (N:K).

изучить влияние на ростовые и синтетические характеристики суспензионной культуры *R. rosea* L. двух источников углеводного питания – сахарозы и глюкозы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила суспензионная культура *R. rosea* L. штамма Rr(S)2013ВИЛАР из коллекции ФГБНУ ВИЛАР (коллекционный номер 04868244-012-2014). Суспензионная культура выращивалась в течение 21 сут в колбах, вместимостью 500 мл, на качалке, совершающей 100 об/мин, без освещения, при температуре 26 °С. Объем заполнения колб питательной средой составлял 1/5

Таблица 1. Схема эксперимента

Исследуемый фактор	Вариант			
	1	2	3	4
N <sup>+</sup>	0,20	0,40	0,60	0,80
K <sup>+</sup>	0,80	0,60	0,40	0,20

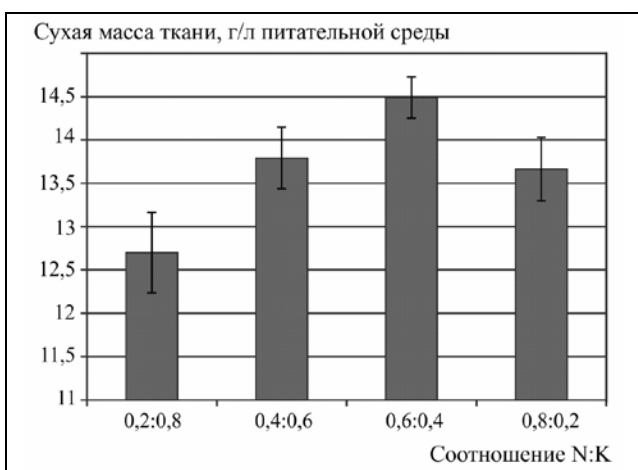


Рис. 1. Зависимость нарастания биомассы суспензионной культуры *R. rosea* L. от отношения N:K (в долях суммы N+K) при их постоянной суммарной концентрации

часть от объема колбы, объем инокулюма – 1/5 от объема питательной среды в колбе. Правило асептики и приёмы посадки общеприняты.

Наращение клеточной культуры оценивали по воздушно-сухой массе в граммах на литр питательного субстрата.

Исследование макроэлементов проводили методом систематических вариантов [7].

Оптимизацию углеводного состава питательной среды осуществляли методом полного факторного эксперимента [8].

Анализ содержания суммы фенилпропаноидов выполняли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра СФ-26 («Ломо», Россия), оснащенного дейтериевой лампой ДДС-30, при длине волны 264 нм. Содержание фенилпропаноидов выражали в процентах на сухую массу ткани [9].

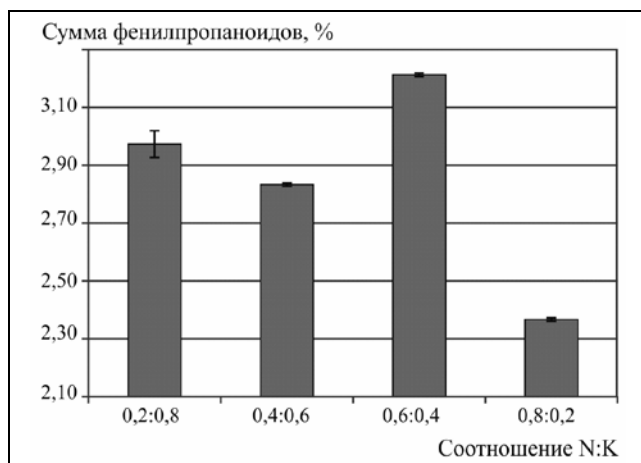
Математическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятыми методами с определением среднего арифметического, среднеквадратического и стандартного отклонения [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макроэлементы азот и калий входят в состав питательной среды по прописям Мурасиге и Скуга в виде двух солей: фосфорнокислого калия (KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>) и азотнокислого аммония (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). В эксперименте изучали воздействие на суспензионную культуру разных концентраций изучаемых факторов при варьировании соотношения между ними при их неизменной суммарной концентрации. Относительное количество каждого из элементов выражали в долях их суммы, принимаемой за единицу, абсолютное – в миллиграмм-атомах. Не изучаемые в эксперименте макроэлементы кальций, магний и фосфор вносились в питательный субстрат согласно их оптимальному содержанию, установленному экспериментально в предыдущих экспериментах, сумма их оставалась на неизменном уровне. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

В результате расчетов, проведенных по используемой методике [8], по опытным вариантам были составлены питательные среды, согласно требованиям постановки экспериментов – соблюдение принципа единственного различия, в вариантах опыта рН среды доводили до 6,4 ед.

На рис. 1 и 2 приведены данные 21-дневного цикла выращивания клеточной культуры родиолы розовой.



**Рис. 2.** Зависимость синтеза суммы фенилпропаноидов суспензионной культурой *R. rosea* L. от отношения N:K (в долях суммы N+K) при их постоянной суммарной концентрации

Из диаграмм видно, что при повышении в питательном субстрате относительного содержания азота или калия нарастание биомассы и содержа-

**Таблица 2.** Содержание макроэлементов в питательных средах, мг-атом

Питательная среда	N <sup>+5</sup>	P <sup>5+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>
По прописи Мурасиге и Скуга	60,06	1,25	20,06	2,99	1,50
Модифицированная	32,05	1,44	48,07	2,3	2,00

**Таблица 3.** Влияние различных источников углевода на рост и биосинтетическую активность биомассы суспензионной культуры *R. rosea* L.

Показатель	Сахароза	Глюкоза
Масса ткани сухая, г/л	12,35±0,06	11,69±0,08
Сумма фенилпропаноидов, %	2,31±0,09	2,28±0,08

Наиболее распространённым источником углевода для выращивания культур клеток растений является дисахарид – сахароза. В эксперименте в сравнении с сахарозой использовался моносахарид – глюкоза C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. Действие углеводов изучали в концентрации, равной 4%. В табл. 3 приведены данные эксперимента.

В результате эксперимента было установлено, что оба углевода способны поддерживать рост и биосинтетическую активность суспензионной культуры *R. rosea* L. Несколько лучшие результаты были получены при использовании в качестве источника углевода сахарозы. Данный углевод по сравнению с глюкозой всего на 5,4% выше стимулировал рост культуры. На содержание суммы фенилпропаноидов изучаемые углеводы влияния не оказывали.

ние суммы фенилпропаноидов увеличивалось и достигало максимума при соотношении азота и калия, равном 0,60:0,40. Расчеты, проведенные по используемому методу, подтвердили оптимальность данного соотношения.

Суммируя результаты исследований, проведенных в два этапа [6], был рассчитан оптимум по всем пяти элементам, входящим в состав макросолей: азота, фосфора, калия, кальция и магния (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что для обеспечения роста суспензионной культуры *R. rosea* L. и накопления в ней суммы фенилпропаноидов, в питательный субстрат необходимо вносить количество азота почти в два раза ниже стандартной величины (прописи Мурасиге и Скуга), калия – почти в два раза выше стандарта. На 35% необходимо повысить содержание магния, на 15% – фосфора, при этом содержание кальция – снизить на 23%. Следует отметить значительную корректировку концентраций макроэлементов азота и калия.

Таким образом, культура клеток *R. rosea* L. может расти на средах, содержащих как сахарозу, так и глюкозу. Однако с экономической точки зрения предпочтительнее использовать в питательных средах в качестве источника углевода – сахарозу, которую можно с успехом заменять пищевым сахаром.

## ВЫВОДЫ

1. Соотношение азота и калия в концентрациях 60 и 40% соответственно обеспечивало достаточно активное нарастание клеточной массы суспензионной культуры *R. rosea* L. и высокий выход суммы фенилпропаноидов.
2. Установлен оптимальный баланс пяти компонентов макросолей: азот, калий, магний, фосфор, кальций, позволяющий поддерживать биопродуктивность суспензионной культуры на высоком уровне.
3. Углеводы сахароза и глюкоза в равной степени поддерживали высокий синтез в ткани суммы фенилпропаноидов и высокий уровень нарастания биомассы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sravanthi M., Gottumukkala Krishna Mohan, Suryakala G., Sandhya Rani M. and Kalakotla Shanker. Plant tissue culture: An alternative for production of useful secondary metabolites // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2016. V. 5. № 4. P. 269–272.
2. Mulabagal V., Tsay H.S. Plant cell cultures – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites // International Journal of Applied Science and Engineering. 2004. V. 2. № 1. P. 29–48.
3. Vijayasree N., Udayasri P., Aswani K.Y., Ravi B.B., Phani K.Y., Vijay V.M. Advancements in the Production of Secondary Metabolites // J. Nat. Prod. 2010. № 3. P. 112–123.
4. Dornenburg H., Knorr D. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures // Food Technology. 1997. № 51. P. 47–54.
5. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2002. № 20. P. 101–153.
6. Савина Т.А., Мясникова С.Б., Балакина М.В. Оптимизация условий выращивания суспензионной культуры родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 9. С. 21–26.
7. Вахмистров Д.Б. Раздельное определение оптимумов суммарной дозы N+P+K и соотношения N:P:K в удобрении // Агрохимия. 1982. № 4. С. 3–12.
8. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта: с основами статистической обработки результатов исследований. М.: Книга по требованию. 2013. 349 с.
9. Цыбулько Н.С., Савина Т.А. Методика количественного определения фенилпропаноидов в клеточной культуре *Rhodiola rosea* // Сборник науч. трудов Всеросс. конф. с междунар. участием «От растения к препарату: традиции и современность», посв. 95-летию А.И. Шретера. М.: ГНУ ВИЛАР. 2014. С. 48–52.

Поступила 23 мая 2018 г.

# THE INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF THE NUTRIENT ENVIRONMENT ON THE GROWTH AND BIOSYNTHETIC INDICATORS OF THE SUSPENSION CULTURE OF RODYOLA ROSE (*RHODIOLA ROSEA* L.)

© Authors, 2018

**T.A. Savina**

Ph.D. (Biol.), Head of Department of Biotechnology, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: savina-tatjana57@yandex.ru

**S.B. Myasnikova**

Research Scientist, Department of Biotechnology, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: vilarnii@mail.ru

**P.S. Savin**

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, Department of Biotechnology, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: savin-pavel@list.ru

In this study a special attention was paid to a possible exogenous regulation of the biological productivity of the cell culture of *Rhodiola rosea* components of the nutrient medium. As a result of the experiments it was found that high growth and biosynthetic indicators of a suspension culture of *Rhodiola rosea* can provide nutritional content in the substrate nitrogen and potassium in the ratio of 0.60:0.40 for the shares the amounts taken per unit and expressed in mg-atoms. On the basis of the conducted experiments the total optimum of five elements with the composition of macrosoma was calculated: nitrogen: phosphorus : potassium: calcium : magnesium, which helps to maintain the productivity of suspension culture at high level.

The carbohydrates are the basis of all nutrient media for the cultivation of cell cultures of plants. The possibility of increasing the amount of phenylpropanoids by introducing in the culture medium of sucrose or glucose at a concentration equal to 4 %. It was established that the components of mineral-based carbohydrates sucrose and glucose equally support the growth and upregulate biosynthetic activity in the suspension culture of *Rhodiola rosea*.

**Key words:** suspension culture, mineral salts, carbohydrates, phenylpropanoid.

**For citation:** Savina T.A., Myasnikova S.B., Savin P.S. The influence of the composition of the nutrient environment on the growth and biosynthetic indicators of the suspension culture of rodyola rose (*Rhodiola rosea* L.). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018; 21(8):9–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-08-02>

## REFERENCES

1. Sravanthi M., Gottumukkala Krishna Mohan, Suryakala G., Sandhya Rani M. and Kalakotla Shanker. Plant tissue culture: An alternative for production of useful secondary metabolites // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2016. V. 5. № 4. P. 269–272.
2. Mulabagal V., Tsay H.S. Plant cell cultures – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites // International Journal of Applied Science and Engineering. 2004. V. 2. № 1. P. 29–48.
3. Vijayasree N., Udayasri P., Aswani K.Y., Ravi B.B., Phani K.Y., Vijay V.M. Advancements in the Production of Secondary Metabolites // J. Nat. Prod. 2010. № 3. P. 112–123.
4. Dornenburg H., Knorr D. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures // Food Technology. 1997. № 51. P. 47–54.
5. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2002. № 20. P. 101–153.
6. Savina T.A., Myasnikova S.B., Balakina M.V. Optimizaciya uslovij vyrashchivaniya suspenzionnoj kul'tury rodioly rozovoj (*Rhodiola Rosea* L.) // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2016. № 9. S. 21–26.
7. Vahmistrov D.B. Razdel'noe opredelenie optimumov summarnoj dozy N+P+K i sootnosheniya N:P:K v udobrenii // Agrohimiya. 1982. № 4. S. 3–12.
8. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta: s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovanij. M.: Kniga po Trebovaniyu. 2013. 349 s.
9. Cybul'ko N.S., Savina T.A. Metodika kolichestvennogo opredeleniya fenilpropanoidov v kletochnoj kul'ture *Rhodiola rosea* // Sbornik nauch. trudov Vseross. konf. s mezhdunar. uchastiem «Ot rasteniya k preparatu: tradicii i sovremennost'», posv. 95-letiyu A.I. Shretera. M.: GNU VILAR. 2014. S. 48–52.