

DOI 10.31029/vestdnc94/4

УДК 633.81:57.085.2

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI *IN VITRO*

С. А. Гревцова<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0001-6967-0246  
Б. Г. Цугкиев<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0003-1050-6606  
Л. Ч. Гагиева<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0002-0566-7854  
А. М. Хозиев<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0002-5847-5223  
Р. Г. Кабисов<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0003-3053-6204  
С. К. Черчесова<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-9867-629X

<sup>1</sup>Горский государственный аграрный университет, Владикавказ, Россия.

<sup>2</sup>Северо-Осетинский государственный университет  
им. К.Л. Хетагурова, Владикавказ, Россия

## OPTIMIZATION OF OBTAINING *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI SUSPENSION CULTURE *IN VITRO*

S. A. Grevtsova<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0001-6967-0246  
B. G. Tsugkiev<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0003-1050-6606  
L. Ch. Gagieva<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0002-0566-7854  
A. M. Hoziev<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0002-5847-5223  
R. G. Kabisov<sup>1</sup>, ORCID: 0000-0003-3053-6204  
S. K. Charchesova<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-9867-629X

<sup>1</sup>Gorsky State Agrarian University, Vladikavkaz, Russia

<sup>2</sup>K.L. Khetagurov North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia

Аннотация. Исследована возможность использования суспензионной культуры травянистого растения *Stevia rebaudiana* Bertoni для получения стевиозида. Листья стевии являются источником дитерпеновых гликозидов, таких как стевиозид и ребаудиозиды, которые в 100–300 раз слаще сахарозы, и применяются для функционального питания больных сахарным диабетом. Результаты эксперимента позволили оптимизировать условия выращивания суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni для дальнейших исследований и промышленного производства: предложены состав питательной среды, начальная концентрация клеток и длительность пассажа. Установлена продолжительность культивирования клеток и оптимальное количество минерального компонента – Se в составе питательной среды Мурасиге – Скоог в количестве 0,5 мг для получения рыхлой каллусной и суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni. Установлено, что наилучший рост культуры обеспечивался внесением суспензии с исходной плотностью для субкультивирования –  $0,8 \times 10^5$  клеток/м. Приведены цитофизиологические характеристики клеточной популяции. В процессе глубокого культивирования плотность суспензии увеличилась в 28 раз. Показано, что продолжительность накопления биомассы суспензионной культуры меньше, чем для каллусной ткани. На протяжении всех фаз цикла роста жизнеспособность клеток достигала 79%. Полученные данные могут быть использованы в области микробиологии и биоинженерии для создания модифицированных каркасов тканеинженерных конструкций.

Abstract. The possibility of using a suspension culture of the herbaceous plant *Stevia rebaudiana* Bertoni to obtain a biologically active substance (stevioside) has been investigated. Stevia leaves are a source of diterpene glycosides, such as stevioside and rebaudiosides which are 100-300 times sweeter than sucrose and are used for functional nutrition in patients with diabetes. The results of the experiment make it possible to optimize the conditions for growing the suspension culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni for further research and industrial production: composition of the nutrient medium, initial concentration of cells and duration of passage. Established have been the duration of cell cultivation and the optimal amount of the mineral component Se in the Murashige – Skoog nutrient medium in the amount of 0,5 mg for obtaining a loose callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni. It has been found that the best growth of the culture is ensured by adding the suspension with initial density for subcultivation of  $0,8 \times 10^5$  cells/m. The cytophysiological characteristics of the cell population are presented. During deep cultivation, density of the suspension increased by 28 times. It has been shown that the duration of biomass accumulation of a suspension culture is shorter than that for callus tissue. Throughout all the phases of the growth cycle, cell viability reaches 79%. The data obtained can be used in the field of microbiology and bioengineering to create modified scaffolds for tissue-engineered structures.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana* Bertoni, каллусная, суспензионная культура, *in vitro*, Se.

Keywords: *Stevia rebaudiana* Bertoni, callus, suspension culture, *in vitro*, Se.

## Введение

В настоящее время в биотехнологии используется большое количество ценных видов растений, многие из которых не являются эндемиками. Для разработки технологии клеточных культур важен выбор подходящего растительного объекта и условий его культивирования. *Stevia rebaudiana* Bertoni – многолетний полукустарник из семейства *Asteraceae*, распространенный преимущественно в тропиках и субтропиках Южной Америки, плохо адаптируется для выращивания в открытом грунте в условиях РСО – Алания. может быть получен в условиях *in vitro* на основе суспензионной модифицированной культуры.

Культивирование клеточной суспензии – это быстрое размножение в жидкой питательной среде, в которой непрерывное перемешивание позволяет поддерживать аэрацию и равномерное распределение клеток в среде. Кроме того, для получения клеточной культуры необходима сбалансированная питательная среда Мурасиге – Скуга (MS) [1–3].

Биотехнологические методы открывают возможности для создания новых ценных биологически активных веществ *in vitro* в изолированных культурах клеток, не используя сложные агротехнические приемы адаптации растений к непривычным климатическим условиям. В настоящее время актуальными являются разработки клеточных технологий, направленных на создание биологически активных веществ – стевиозида с использованием каллусных тканей и биологически активных веществ суспензионных культур *Stevia rebaudiana* Bertoni [1–8]. Получение стевиозида на основе растения позволяет заменить высококалорийную сахарозу на натуральный непитательный подсластитель. Химический синтез продукта очень чувствителен и трудоемок, соответственно, исследования направлены на создание альтернативных методов получения БАВ на основе *Stevia rebaudiana* Bertoni [1, 5, 7]. Использование суспензии данного растения является наиболее эффективным и экологичным способом для получения продуктов вторичного метаболизма [2, 4, 10, 11]. Для данного способа культивирования необходимы рыхлые каллусные культуры, которые свободно располагаются в питательной среде и способны к клеточному делению.

Стимулирование пролиферации используется в биоинженерии для создания модифицированных каркасов тканеинженерных конструкций [3, 11]. Пролиферация регулируется стимуляторами – гормонами, металлами и различными ингибиторами, которые могут вырабатываться как внутри клеток, так и вне их [3, 6, 8, 12]. В наших исследованиях использовали селен (Se), который способствует ускоренной пролиферации клеток.

Цель исследований – получение биомассы культуры клеток *Stevia rebaudiana* Bertoni на основе разных вариантов питательной среды Мурасиге – Скуга.

## Материалы и методы

Объектом исследований явились ткани и органы растения *Stevia rebaudiana* Bertoni (рис. 1), выращенного в условиях коллекционного питомника Горского ГАУ. Для достижения поставленной цели была составлена схема исследований.

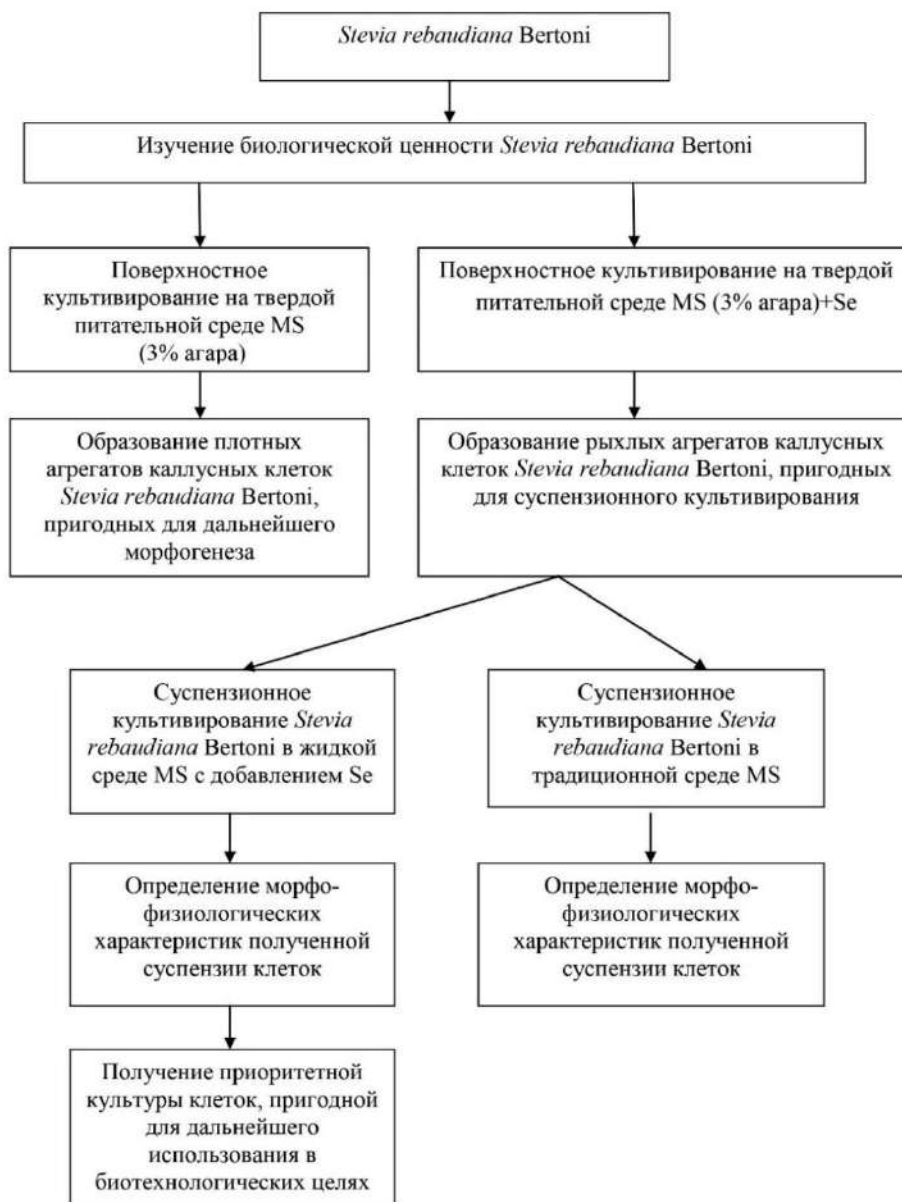
Для работы использовали биотехнологические методы исследований культуры органов и тканей растений, предназначенных для получения каллусов из сегментов листовой пластинки. Все процедуры проводились в условиях ламинарного бокса.



Рис. 1. Объект исследований *Stevia rebaudiana* Bertoni

Биологическое загрязнение является серьезной проблемой в культуре тканей растений. Соответственно, для создания аксеновой культуры, свободной от загрязнения, применяли оригинальный протокол обеззараживания экспланта: двукратное промывание в дистиллированной воде, выдерживание в гипохлорите кальция  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , дистиллированной воде (для нейтрализации действия  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ), помещение в раствор с перекисью водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) – в течение 5 минут и в завершение промывание в дистиллированной воде в течение 10 минут в двойной повторности.

Схема эксперимента



Для проведения эксперимента были составлены 4 варианта среды MS: агаризованные – традиционная среда и с добавлением Se (0,5 мг/л); жидкие – традиционная среда и с добавлением Se (0,5 мг/л) (см схему эксперимента).

Осуществляли два типа культивирования клеток стевии *Stevia rebaudiana Bertoni*: поверхностное и глубинное. Поверхностное – на агаризованной питательной среде MS с добавлением 3% агара на 1 литр среды и глубинное – на той же среде MS, но без добавления агара (рис. 2, схема эксперимента).

Поверхностное культивирование калусных клеток осуществляли в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды MS; суспензионных культур – в лабораторном ферментере емкостью 1000 мл с заполнением его до 1/3 жидкой питательной средой MS. В биореакторе перемешивание экспериментальной среды MS осуществляли путем аэрирования воздухом за счет поднимающихся пузырьков воздуха при помощи барботажного биореактора. Выращивание осуществляли при температуре  $23\pm 2^\circ\text{C}$ , относительной влажности воздуха 6%, освещенности 500 Люкс с двенадцатичасовым фотопериодом.

На первом этапе проводили твердофазное культивирование. Полученные калусные культуры пассировали в асептических условиях каждые 7 суток. Проводили два пассажа.

На втором этапе для получения суспензионной культуры 3 г калусной культуры помещали в лабораторный ферментер с жидкой питательной средой. При пассировании суспензии каждые 24 часа отбирали инокулюм. В каждом варианте анализировали не менее трех проб суспензий. В процессе культивирования определяли: агрегированность и жизнеспособность, цитофизиологические параметры, плотность суспензии.

Агрегированность определяли по соотношению различных клеточных агрегатов, выделяя одиночные клетки и агрегаты из нескольких клеток.



Рис. 2. Проведение стерилизации эксплантов стевии *Stevia rebaudiana* Bertoni

Для определения плотности культуры отбирали инокулюм и подсчитывали число клеток в камере Горяева. Суспензионную культуру в количестве 1 мл смешивали с 2 мл 8%-го оксида хрома и оставляли на 15 мин в термостате при температуре  $70^\circ\text{C}$ . Смесь пропускали через шприц с толстой иглой (пипетировали). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Подсчет клеток осуществлялся в пяти больших квадратах (в четырех – по диагонали и в одном – в любом верхнем или нижнем углу сетки). Плотность суспензии, т.е. число клеток, рассчитывали (в мл) по формуле

$$X = M \times N \times 1000/3,2,$$

где X – число клеток в мл; M – среднее число клеток в камере; N – разведение; 3,2 – постоянная величина.

Для определения жизнеспособности полученной биомассы клеток использовали краситель ацетокармин.

### Результаты исследований

В процессе исследования было изучено влияние состава питательной среды на скорость роста и качественные характеристики биомассы клеток стевии *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Эксперимент проводился в двух вариантах: на традиционной и модифицированной среде MS с добавлением Se. Экспланты листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni использовали как основной материал для получения культуры тканей растений. Получение калусной ткани осуществляли из различных фрагментов листа *Stevia rebaudiana* Bertoni размером 1–3 мм, которые помещали на агаризованные питательные среды MS и MS + Se. Экспланты набухали и на поверхности срезов образовывались калусные культуры. Калусная ткань на модифицированной среде с добавлением Se (0,5 мг/л) имела грязно-белый цвет и более рыхлую консистенцию, чем каллус, полученный на традиционной среде, – более плотной консистенции и с желтоватым оттенком (рис. 3).



а



б

**Рис. 3.** Каллусная культура стевия *Stevia rebaudiana* Bertoni:  
а) питательная среда MS + Se; б) питательная среда MS

Так как клетки рыхлой каллусной ткани делятся с большей скоростью, для получения биомассы суспензионной культуры использовали грязно-белые рыхлые клетки, выращенные на среде с добавлением Se; желтоватые клетки плотной консистенции могли быть использованы для изучения морфогенеза.

Следующим этапом являлось получение первичной суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni. Использовали два лабораторных ферментера с барботером: первый – с традиционной питательной средой MS, второй – MS + Se (рис. 4). Каллусные культуры в количестве 3 г переносили в биореактор и осуществляли глубинное культивирование на средах: традиционной MS и MS + Se.



а



б

**Рис. 4.** Культивирование суспензионных культур в жидкой питательной среде:  
а) питательная среда MS + Se; б) питательная среда MS

Как известно, плазматическая мембрана живых клеток непроницаема для крупных анионов использованного нами красителя, соответственно, они остаются неокрашенными. Было показано, что первичная суспензионная культура, выращенная на питательной среде MS + Se, имела более высокий процент жизнеспособности – 79%, но низкое содержание одноклеточной фракции (6%) (рис. 5).



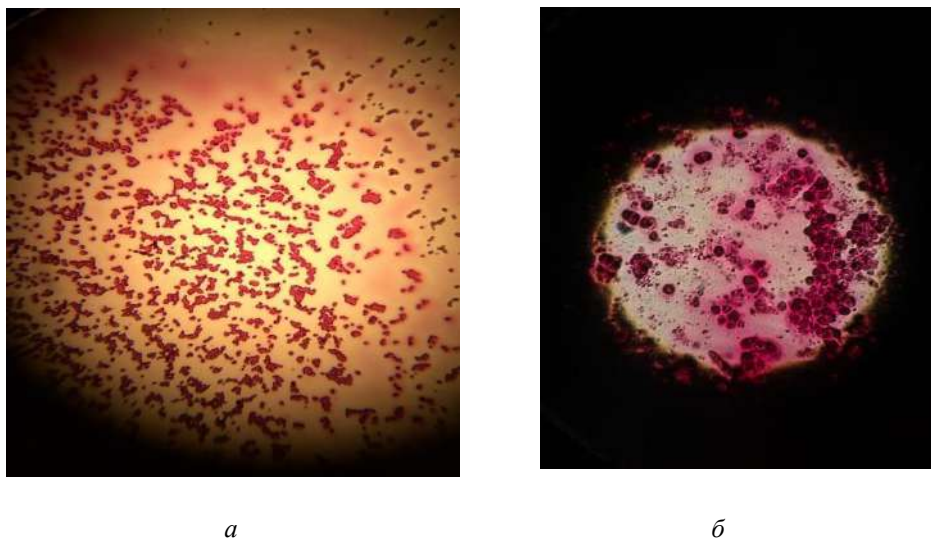


Рис. 5. Определение жизнеспособности суспензионной *Stevia rebaudiana* Bertoni: а) питательная среда MS + Se; б) питательная среда MS

В суспензионной культуре обнаружены одиночные клетки, клеточные группы (2–10 клеток) и многоклеточные агрегаты. Качество суспензии определяли соотношением между одиночными клетками и агрегатами. Степень агрегации суспензионной культуры подразделяли на три типа: слабоагрегированные (40% одиночных клеток, 60% клеточных групп), среднеагрегированные (40% одиночных клеток, 40% клеточных групп, 20% крупных агрегатов) и высокоагрегированные (более 50% клеток в агрегате). Результаты определения агрегированности клеток в культуре приведены в таблице.

**Влияние исходной плотности культуры и питательной среды на плотность и жизнеспособность суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni**

| Варианты эксперимента (питательная среда) | Образец  | Плотность суспензии, число клеток $\times 10^5$ /мл (в начале эксперимента) | Плотность суспензии в цикле выращивания, число клеток $\times 10^5$ /мл |                | Прирост плотности суспензии клеток за 14 сут, % к исходной | Доля жизнеспособных клеток на 14 сут, % |
|-------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                           |          |                                                                             | 7 сут                                                                   | 14 сут         |                                                            |                                         |
| MS + 0,5 мг/л Se                          | St 1+ Se | 0,8                                                                         | 18,7 $\pm$ 0,7                                                          | 25,1 $\pm$ 1,2 | 2753,9                                                     | 78,2 $\pm$ 0,7                          |
|                                           | St2+ Se  | 1,7                                                                         | 27,9 $\pm$ 1,3                                                          | 40,3 $\pm$ 1,7 | 2304,1                                                     | 72,1 $\pm$ 1,2                          |
|                                           | St3+ Se  | 2,5                                                                         | 22,4 $\pm$ 1,4                                                          | 48,9 $\pm$ 1,8 | 1879,6                                                     | 65,4 $\pm$ 1,2                          |
|                                           | St4+ Se  | 6,4                                                                         | 17,9 $\pm$ 0,8                                                          | 59,3 $\pm$ 1,5 | 901,4                                                      | 59,2 $\pm$ 1,7                          |
|                                           | St5+ Se  | 12,3                                                                        | 35,1 $\pm$ 1,5                                                          | 75,5 $\pm$ 1,8 | 596,8                                                      | 60,5 $\pm$ 1,9                          |
|                                           | St6+ Se  | 18,1                                                                        | 37,1 $\pm$ 1,7                                                          | 78,9 $\pm$ 2,0 | 622,1                                                      | 56,2 $\pm$ 1,5                          |
| MS традиционная                           | St1      | 0,8                                                                         | 16,9 $\pm$ 0,8                                                          | 21,8 $\pm$ 0,8 | 2532,0                                                     | 63,7 $\pm$ 1,4                          |
|                                           | St2      | 1,7                                                                         | 27,1 $\pm$ 1,2                                                          | 32,4 $\pm$ 1,2 | 2309,2                                                     | 77,9 $\pm$ 2,1                          |
|                                           | St3      | 2,5                                                                         | 22,5 $\pm$ 1,2                                                          | 58,4 $\pm$ 2,2 | 1805,0                                                     | 49,4 $\pm$ 1,2                          |
|                                           | St4      | 6,4                                                                         | 17,6 $\pm$ 1,2                                                          | 42,7 $\pm$ 1,9 | 669,4                                                      | 52,1 $\pm$ 1,1                          |
|                                           | St5      | 12,3                                                                        | 22,6 $\pm$ 0,9                                                          | 62,4 $\pm$ 1,7 | 482,4                                                      | 59,3 $\pm$ 1,4                          |
|                                           | St6      | 18,1                                                                        | 28,4 $\pm$ 0,9                                                          | 63,1 $\pm$ 1,4 | 432,1                                                      | 51,2 $\pm$ 1,2                          |

Полученные результаты показали, что исходная плотность клеточной суспензии *Stevia rebaudiana* Bertoni оказывала влияние на важные физиологические показатели. Наибольший прирост плотности наблюдался при использовании объема инокулюма в количестве  $0,8-1,6 \times 10^5$  клеток/мл. При дальнейшем увеличении исходной плотности рост культуры, соответственно, замедлялся, при этом количество живых клеток в суспензии уменьшалось. Использование исходной плотности  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл и выше приводило также к снижению жизнеспособности популяции. Поэтому при росте на MS + Se рекомендуется использование исходной плотности  $0,8 \times 10^5$  клеток/мл, при которой наблюдался высокий прирост

плотности и жизнеспособность. Причем за две недели культивирования происходил почти 18-кратный прирост плотности, а жизнеспособность составила 79%.

Это исследование позволило оптимизировать условия культивирования суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni. Оптимизированы параметры технологического процесса: состав питательной среды, начальная концентрация клеток и длительность пассажа. Это важно для дальнейших исследований и промышленного производства клеточной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni.

### Заключение

Разработаны режимы получения и длительного культивирования клеточной суспензии с использованием стевии *Stevia rebaudiana* Bertoni, обеспечивающие хороший рост, 79% жизнеспособность популяции и 28-кратный прирост плотности. Предложено внесение 0,5 мг Se в состав питательной среды Мурасиге – Скуга для получения рыхлой каллусной и суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni. Определены цитофизиологические характеристики популяции клеток в цикле выращивания суспензии и продолжительность основных фаз цикла выращивания. Показана возможность использования суспензионной культуры *Stevia rebaudiana* Bertoni, выращенной на среде Мурасиге – Скуга + Se, для получения стевизоида.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2017. № 1 (9). С. 16–27.
2. Калашикова Е.А. Клеточная инженерия растений. М.: РГАУ-МСХА, 2012. 318 с.
3. Гревцова С.А., Наниева Л.Б. Суспензионное культивирование каллусных клеток *S. oppositifolium* // Известия Горского государственного аграрного университета. 2013. Т. 50, № 4. С. 272–274.
4. Moniruzzaman M., Zhong Y., Huang Z., Yan H., Yuanda L., Jiang B., Zhong G. Citrus cell suspension culture establishment, maintenance, efficient transformation and regeneration to complete transgenic plant // Plants. 2021. N 10 (4). P. 664–676.
5. Najah M.Yu., Jafar H.Z., Nakasha J.J., Hakiman M. Shoot propagation and callus induction in *Labisia pumila* var. *alata* under the influence of various treatments with plant growth regulators and its polyphenolic activity in comparison with wild plants // Molecules. 2021. N 26 (11). P. 3229.
6. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. № 5. С. 8–28.
7. Рехвиашвили Э.И., Гревцова С.А., Абаев А.А., Айлярова М.К., Кабулова М.Ю. Инновационные методы получения каллусной культуры якона *Smallanthus sonchifolius* // Известия Горского государственного аграрного университета. 2022. Т. 59-1. С. 180–186.
8. Cortese E., Carraretto L., Baldan B., Navazio L. Arabidopsis photosynthetic and heterotrophic cell suspension cultures // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2021. N 2200. P. 167–185.
9. Babich O., Sukhikh S., Pungin A., Ivanova S., Asyakina L., Prosekov A. Modern trends in the *in vitro* production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants // Molecules. 2020. Vol. 25 (24). P. 5805–5819.
10. Наконечная О.В., Гафицкая И.В., Бурковская Е.В., Хроленко Ю.А., Грищенко О.В., Журавлев Ю.Н., Субботин Е.П., Кульчин Ю.Н. Влияние интенсивности света на морфогенез *Stevia rebaudiana* в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2019. Т. 66, № 4. С. 304–312.
11. Шмарова А.А., Терентьева О.А., Каухова И.Е., Пивоварова Н.С. Суспензионное культивирование растительных клеток: современные подходы и проблемы при получении лекарственных веществ (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2022. Т. 56, № 2. С. 33–41.
12. Кочетов А.А., Синявина Н.Г. Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni): биохимический состав, терапевтические свойства и использование в пищевой промышленности (обзор) // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 5–27.

Поступила в редакцию 12.07.2024 г.  
Принята к печати 26.09.2024 г.

\* \* \*

**Гревцова Светлана Алексеевна**, кандидат биологических наук, доцент, Горский государственный аграрный университет; e-mail: grevzovasvetlana@yandex.ru

**Svetlana A. Grevtsova**, Candidate of Biology, associate professor, Gorsky State Agrarian University; e-mail: grevzovasvetlana@yandex.ru

**Цугкиев Борис Георгиевич**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Горский государственный аграрный университет; e-mail: zugkiev@mail.ru

**Boris G. Tsugkiev**, Doctor of Agricultural Sciences, professor, Gorsky State Agrarian University; e-mail: zugkiev@mail.ru

**Гагиева Лариса Черменовна**, доктор биологических наук, доцент, Горский государственный аграрный университет; e-mail: laragagieva@yandex.ru

**Larisa Ch. Gagieva**, Doctor of Biology, associate professor, Gorsky State Agrarian University; e-mail: laragagieva@yandex.ru

**Хозиев Алан Макарович**, кандидат биологических наук, доцент, Горский государственный аграрный университет; e-mail: hoziev\_alan@mail.ru

**Alan M. Hoziev**, Candidate of Biology, associate professor, Gorsky State Agrarian University; e-mail: hoziev\_alan@mail.ru

**Кабисов Руслан Гельбертович**, доктор биологических наук, доцент, Горский государственный аграрный университет; e-mail: ruslan\_kabisov@mail.ru

**Ruslan G. Kabisov**, Doctor of Biology, associate professor, Gorsky State Agrarian University; e-mail: ruslan\_kabisov@mail.ru

**Черчесова Сусанна Константиновна**, доктор биологических наук, доцент, Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова; e-mail: cherchesova@yandex.ru

**Susanna K. Cherchesova**, Doctor of Biology, associate professor, K.L. Khetagurov North Ossetian State University; e-mail: cherchesova@yandex.ru