

На правах рукописи



Ханды Мария Терентьевна

**Особенности образования стероидных гликозидов в культурах клеток
Dioscorea deltoidea, *Tribulus terrestris* и *Trigonella foenum-graecum***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре физиологии растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Носов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Калашникова Елена Анатольевна,

доктор биологических наук, профессор

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева», профессор кафедры генетики и биотехнологии, г. Москва

Заварзин Игорь Викторович,

доктор химических наук,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского Российской академии наук, заведующий лабораторией химии стероидных соединений, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань

Защита состоится «20» декабря 2016 г. в __ часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499)-977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» ноября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

Актуальность проблемы. Культура клеток высших растений является уникальной биологической системой – экспериментально полученной популяцией соматических клеток. Многие фундаментальные исследования показали, что клетки *in vitro* по ряду характеристик кардинально отличаются от клеток в составе растения. В отличие от клеток в составе организма, образование вторичных соединений в культуре происходит в постоянно пролиферирующих клетках, вследствие чего качественный и количественный состав этих соединений в клетках *in vitro* может существенно отличаться от таковых в интактных растениях. Как правило, в культуре клеток содержание вторичных метаболитов ниже, чем в целых растениях, в то же время известны примеры, когда клетки *in vitro* в несколько раз превосходят по содержанию этих веществ интактные растения. Таким образом, до настоящего времени закономерности и механизмы образования и накопления биологически активных веществ специализированного обмена в культурах клеток высших растений практически не изучены.

Стероидные гликозиды являются одним из обширных и широко используемых классов вторичных метаболитов. Эти соединения обладают высокой биологической активностью, на их основе созданы различные медицинские препараты и ряд биологически активных добавок. К настоящему времени запасы сырья растений, служащих источниками стероидных гликозидов, практически истощены.

В Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН) в конце прошлого века был получен ряд штаммов суспензионных культур клеток диоскореи дельтовидной *Dioscorea deltoidea* Wall. и изучены их ростовые и биосинтетические характеристики. Было показано, что эти культуры синтезируют, в отличие от интактного растения, преимущественно фуростаноловые, но не спиростаноловые гликозиды, при этом основными соединениями являются протодиосцин и дельтозид, а также их (25S)-изомеры, не характерные для интактного растения. Один из штаммов (ИФР-ДМ-0,5) был охарактеризован как сверхпродуцент фуростаноловых гликозидов (ФГ) (до 15% от сухой биомассы клеток). Синтез клетками стероидных гликозидов оказался весьма стабильным и практически не

изменялся в течение более 30 лет выращивания культур. На основании проведенных исследований была выдвинута гипотеза, что в клетках *in vitro* образуются преимущественно соединения, способствующие пролиферации клеток, а в процессе длительного субкультивирования происходит автоселекция клеток, содержащих подобные вещества. Однако эта гипотеза, сформулированная на основании изучения культур клеток растений только одного вида, требует проверки и более серьезных доказательств. Таким образом, детальный фитохимический анализ стероидных гликозидов и оценка физиологических показателей культур клеток растений-продуцентов является актуальной фундаментальной и прикладной задачей.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – изучить общие закономерности и механизмы регулирования образования стероидных гликозидов в культурах клеток высших растений.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительный фитохимический анализ содержания разных форм фураностаноловых гликозидов (ФГ) в различных линиях штамма-сверхпродуцента ИФР-ДМ-0,5 культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.

2. Провести изучение уровня стабильности физиологических и биосинтетических характеристик разных линий штамма ИФР-ДМ-0,5 культуры клеток *D. deltoidea* как при длительном выращивании в растущей коллекции, так и после криоконсервации.

3. Для выяснения сигнальных механизмов регулирования образования стероидных гликозидов провести исследование влияния ингибиторов цитозольного и пластидного путей образования изопреноидов, а также регуляторов роста на физиологические и фитохимические характеристики культуры клеток *D. deltoidea*.

4. Для выяснения общих закономерностей образования стероидных гликозидов в клетках *in vitro* получить суспензионные культуры клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. и пажитника греческого *Trigonella foenum-graecum* L. и исследовать их ростовые, физиологические и биосинтетические характеристики.

5. Для выяснения сигнальных механизмов регулирования образования стероидных гликозидов провести исследование влияния регуляторов роста на

физиологические и фитохимические показатели полученных суспензионных культур клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum*.

6. Осуществить выращивание исследуемых культур клеток в биореакторах и изучить изменения содержания стероидных гликозидов при аппаратурном культивировании в разных режимах.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование механизмов образования разных форм ФГ в культурах клеток *D. deltoidea*, *T. terrestris* и *T. foenum-graecum*. Показано повышение накопления S-форм при длительном культивировании. Впервые получены суспензионные культуры клеток якорцев. Доказан отбор клеток *in vitro* по показателю синтеза ФГ при длительном культивировании.

Практическая значимость. Проведенные фитохимические анализы при выращивании культур клеток *D. deltoidea* будут полезны для производства биомассы культуры клеток с целью получения биологически активных субстанций, имеющих в своем составе стероидные гликозиды. Полученные штаммы *T. terrestris* и *T. foenum-graecum*, при соответствующей оптимизации синтеза, станут источником новых стероидных гликозидов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, «Ломоносов-2014» (Москва, 2014), Всероссийской научной конференции с международным участием и в Школе молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), Всероссийской научной конференции с международным участием и в Школе молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии» (Москва, 2015)

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ в научных журналах, материалах конференций и научных сборниках (в том числе 4 – в журналах, рекомендованных ВАК).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты и их обсуждения», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Приложения». Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 41 рисунок и 18 таблиц. Список цитируемой литературы включает 143 наименования, из которых 89 – на иностранных языках.

Автор выражает благодарность за идентификацию стероидных гликозидов и совместную работу научному сотруднику кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Д.В. Кочкину и сотрудникам кафедры физиологии и биохимии растений департамента «Биологический факультет» ИЕН УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина Б.А. Галишеву и С.В. Томиловой. За поддержку и помощь в работе автор выражает благодарность коллективу лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили:

1. Суспензионные культуры диоскореи дельтовидной *Dioscorea deltoidea* Wall.:
 - штамм ИФР-ДМ-0,5 (ДМ-0,5-К) – сверхпродуцент ФГ (номер во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР) 6);
 - линии ИФР-ДМ-0,5-2У (2У) и ИФР-ДМ-0,5-03 (03), полученные после обработки мутагеном N-нитрозо-N-метилмочевинной коллекционного штамма ИФР-ДМ-0,5 с последующей селекцией по интенсивности роста культуры клеток.
2. Суспензионная культура клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. (номер во ВККК ВР 81).
3. Суспензионная культура клеток пажитника греческого *Trigonella foenum-graecum* L. (номер во ВККК ВР № 87).

Методы выращивания и исследования ростовых характеристик культур клеток. Выращивание всех исследуемых культур клеток проводили в

модифицированных средах Мурасиге-Скуга (Murashige, Scoog, 1962) с добавлением сахарозы, витаминов и регуляторов роста (в соответствии с паспортами в ВККК ВР).

Культивирование проводили в темноте при 26°C. Цикл субкультивирования для каллусных культур клеток составлял 4 недели, для суспензионных – 2 недели. Каллусы выращивали в чашках Петри (d=60 мм), суспензионные культуры клеток – в колбах объемом 250 мл (30-40 мл суспензии в колбе) на качалке (100 об/мин.).

Аппаратурное выращивание осуществляли в 7-литровом биореакторе New Brunswick Scientific (США) с механическим перемешиванием и в 20-литровом барботажном биореакторе рабочим объемом 15 л. Расход воздуха – 0,1-1,0 л/л/мин., скорость перемешивания – 200 об/мин, концентрацию растворенного кислорода (pO₂) поддерживали на уровне 10-40% от насыщения, температура выращивания 26±0,5°C.

Для характеристики суспензионных культур определяли содержание сухой и сырой биомассы в 1 л среды, концентрацию клеток в среде и жизнеспособность культуры по общепринятым методикам (Бутенко, 1964). По полученным результатам рассчитывали индекс роста (*I*), удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (*μ*), экономический коэффициент (*Y*), время удвоения (*τ*) и продуктивность (*P*) исследуемых культур (Носов, 2011).

Методы получения культур клеток. Для получения каллусной культуры клеток якорцев в качестве эксплантов были использованы семена растения *T. terrestris*. Для получения суспензионных культур клеток *T. terrestris* в качестве экспланта использовали 4-недельную каллусную культуру после 3-го цикла выращивания. Для экспериментов использовали 9 вариантов модифицированных сред MS, отличающихся по составу регуляторов роста (НУК, 2,4-Д, кинетин, БАП).

Для получения суспензионных культур клеток *T. foenum-graecum* в качестве экспланта использовали гетеротрофный каллус листового происхождения *T. foenum-graecum* ярового сорта Ovari 4 (ЛКЯС) (Юрин и др., 2009).

Качественный и количественный анализ стероидных гликозидов в суспензионных культурах клеток проводили с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрометрического анализа,

высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) и ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (УЭЖХ МС).

Для приготовления проб биомассу экстрагировали 70% этиловым спиртом

Для ТСХ анализа использовали пластинки Kieselgel 60 (Merck, Германия). ФГ элюировали в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (65:35:10 по объему). Хроматограммы проявляли реактивом Эрлиха. Для разделения спиростаноловых гликозидов использовали систему этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (32:9:9 по объему). Хроматограммы проявляли 1%-м раствором ванилина серного.

Для количественного анализа ФГ использовали спектрофотометр «Униплан» (Россия). К экстрактам биомассы добавляли реактив Эрлиха, смесь выдерживали 2 часа при $50 \pm 1^\circ\text{C}$ и проводили измерение оптической плотности при 520 нм.

ВЭЖХ проводили на приборах: Agilent 1200 Series (США) с колонкой Pecosphere 3CRC18 (83×4,6 мм, 3 мкм) и Shimadzu Nexera LC30 (Япония) с колонкой Shim-pack XR-ODS (75×2,0 мм, 2,2 мкм). В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил и воду. Элюирование осуществляли в изократическом режиме. Детектирование по поглощению при 203 нм. Количественное содержание индивидуальных ФГ определяли по стандарту протодиосцина с чистотой 98%.

УЭЖХ МС проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (США). Колонка ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-й (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде или ацетонитриле. Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентной элюции. Анализ осуществляли в режиме детекции положительных ионов (диапазон m/z 100-1200) при температуре источника ионизации 120°C и температуре десольвации 250°C , напряжение на капилляре – 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота – 600 л/ч.

Для исследования влияния метилжасмоната метиловый эфир жасминовой кислоты добавляли в среду в концентрации 100 мкМ на 6-е сутки выращивания культур.

Для изучения энергетического обмена (интенсивности дыхания) культур клеток использовали полярографическую установку с непроточной ячейкой и электродом Кларка. Для определения вклада различных путей дыхания применяли ингибиторы: азид натрия (NaN_3 , 5 мМ), подавляющий цитохромксидазный комплекс, и салицилгидроксамовую кислоту (SHAM, 10 мкМ), блокирующую альтернативное дыхание (Karulnik et al., 1992; Титова и др., 2015).

Для исследования влияния ингибиторов изопреноидного биосинтеза растворы ингибиторов добавляли в питательную среду при пересадке культуры в концентрации: 200 мкМ – фосмидомицина и 1 мкМ – мевинолина.

Обработка данных и представление результатов. На графиках и диаграммах представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения из не менее трех биологических повторностей для каждого эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Особенности образования стероидных гликозидов в культуре клеток *Dioscorea deltoidea*

Первым этапом работы явилось изучение стабильности образования стероидных гликозидов в трех линиях (ДМ-0,5-К, 2У и 03) культуры клеток *D. deltoidea* в процессе длительного субкультивирования (7-28 лет). Было установлено, что все исследуемые линии содержат фуростаноловые гликозиды (ФГ) протодиосцин, дельтозид, а также их (25S)-изомеры. При этом общее содержание ФГ в изучаемых линиях может варьировать более чем в 2 раза в зависимости от года сбора материала. Показано, что наиболее стабильной по количественному и качественному составу ФГ является линия 2У. Сумма ФГ в сухой массе клеток этой линии сохранялась на уровне 10-14% при стабильном соотношении протодиосцин : дельтозид от 2:1 до 3:1 (для расчета использовали суммарное содержание (25R)- и (25S)-изомеров). Для линии ДМ-0,5-К общее содержание ФГ в сухой массе клеток варьировало от 6 до 14%, в линии 03 – от 8 до 16%. При этом соотношение протодиосцин : дельтозид изменялось в диапазоне от 1:1 до 10:1 в ДМ-0,5-К и от 4:1 до 8:1 в 03 (рис. 1).

Соотношение содержания протодиосцина и его (25S)-изомера во всех случаях четко коррелирует с аналогичным соотношением содержания дельтозида с его (25S)-аналогом вне зависимости от линии и года сбора материала. Следовательно, можно сделать вывод, что синтез (25S)-форм ФГ взаимосвязан с количеством (25R)-форм гликозидов в клетке. Обнаруженная закономерность требует дальнейшего изучения, так как из литературы известно, что стереохимическое расположение заместителей у С-25 атома агликонов ФГ фиксируется на ранних стадиях биосинтеза, при этом (25R)- и (25S)-эпимеры не могут взаимопревращаться (Васильева, Пасешниченко, 2000).

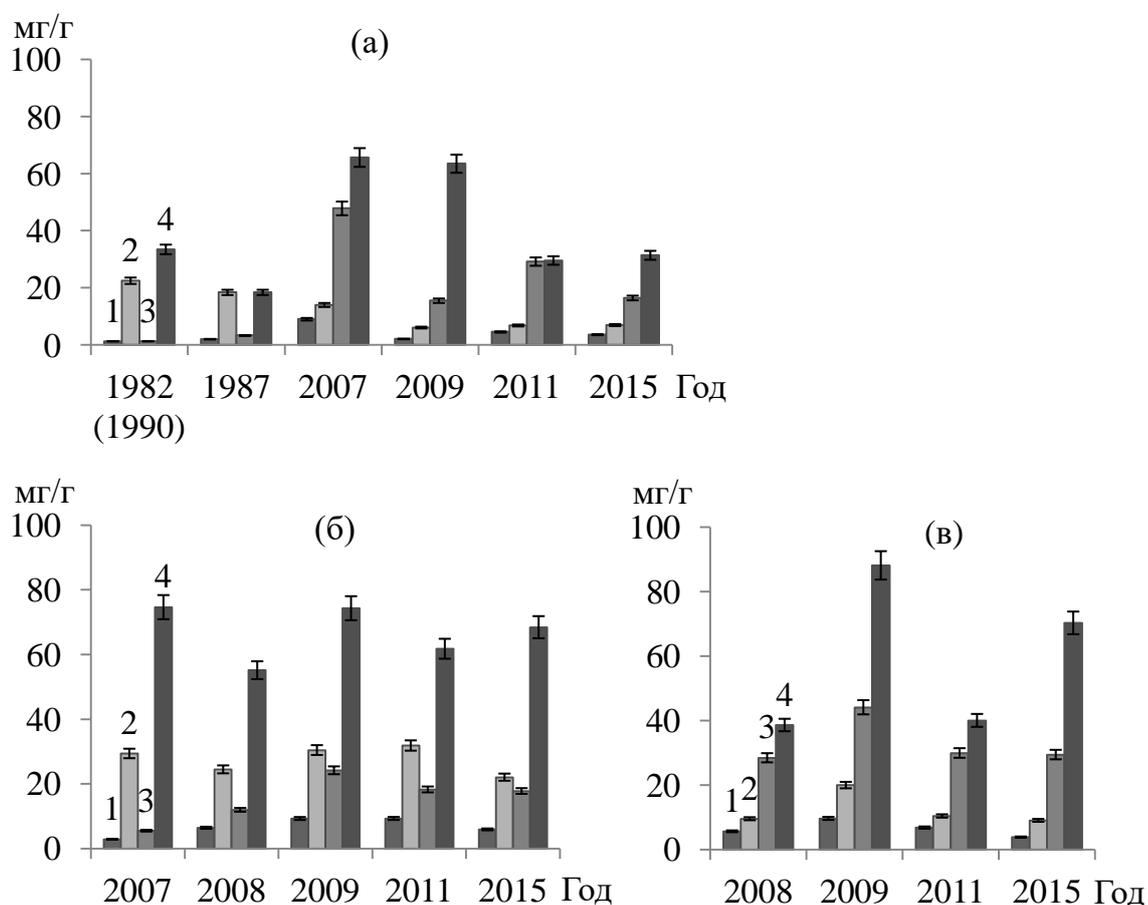


Рис. 1. Качественный и количественный состав ФГ (мг/г сухой массы клеток) в разных линиях штамма ИФР-ДМ-0,5 при длительном культивировании.

Обозначения: (а) – линия ДМ-0,5-К; (б) – линия 2У; (в) – линия 03;

1 – (25S)-дельтозид, мг/г; **2** – дельтозид, мг/г;

3 – (25S)-протодиосцин, мг/г; **4** – протодиосцин, мг/г;

1982 (1990) – биомасса линии ДМ-0,5-К, собранная в 1990 году, 1-й цикл выращивания после хранения в жидком азоте (хранилась в криобанке с 1982 года)

Ростовые и биосинтетические характеристики разных линий *Dioscorea deltoidea*

Для выяснения закономерностей образования стероидных гликозидов в цикле выращивания исследовали ростовые характеристики линий ДМ-0,5-К, 2У и 03 культуры клеток *D. deltoidea*, а также накопления ими протодиосцина, дельтозида и их (25S)-изомеров. Было показано, что все изученные линии характеризуются высокими показателями роста ($I \geq 6$; $\mu = 0,10-0,13$ сут.⁻¹; $\tau = 5-7$ сут.; $M_{max} \geq 9$ г/л) и жизнеспособности (выше 70%). Экономический коэффициент Y для исследуемых линий находится в пределах 0,2-0,3, что свидетельствует об эффективном использовании клетками субстрата (сахарозы) (рис. 2).

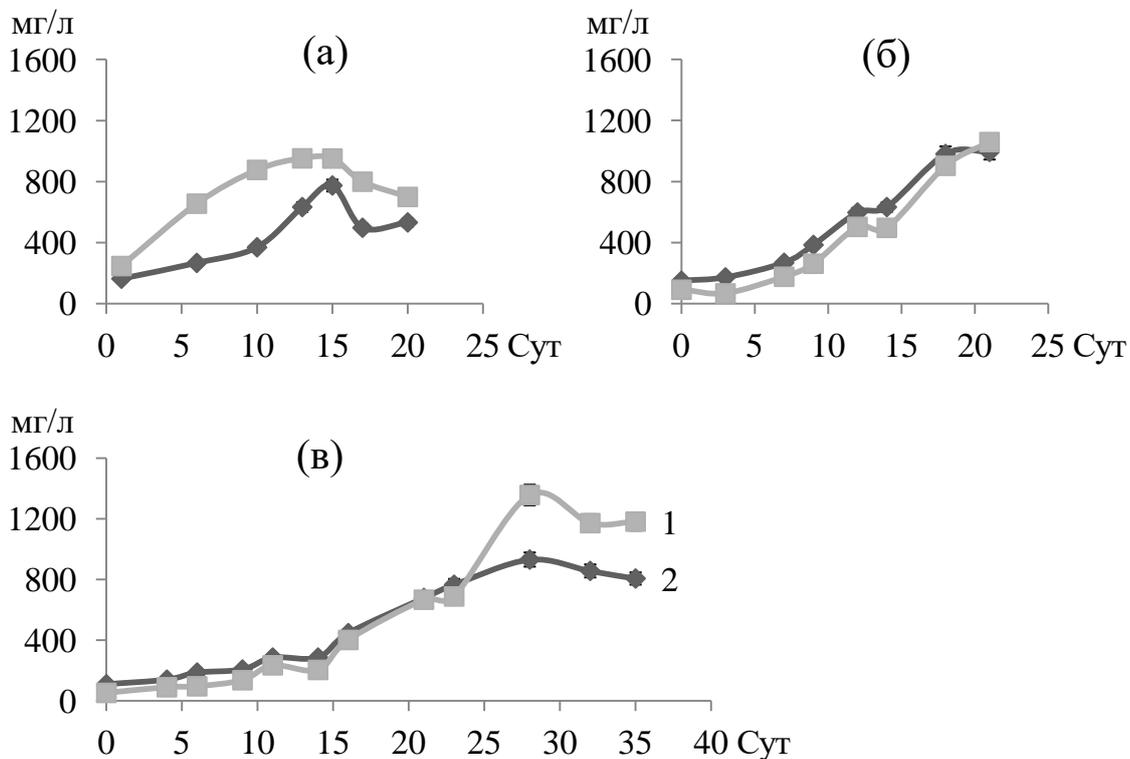


Рис. 2. Кривая роста и содержание фураностаноловых гликозидов на литр среды культуры клеток *D. deltoidea* (ИФР-ДМ-0,5) при стандартном выращивании в колбах.

Обозначения: (а) – коллекционная линия; (б) – линия 2У; (в) – линия 03;
1 – сухая масса клеток, (г/л)·100; 2 – суммарное содержание ФГ, мг/л

В результате анализа стероидных гликозидов в цикле выращивания установили, что максимальное содержание ФГ для линии ДМ-0,5-К составляет 81 мг/г, линии 2У

– 106 мг/г и линии 03 – 147 мг/г и приходится на фазы стационара и начала деградации культуры, минимальное (40-50 мг/г) – на периоды лаг-фазы и ускорения роста, что, возможно, связано со стрессовым состоянием клеток после их пересева.

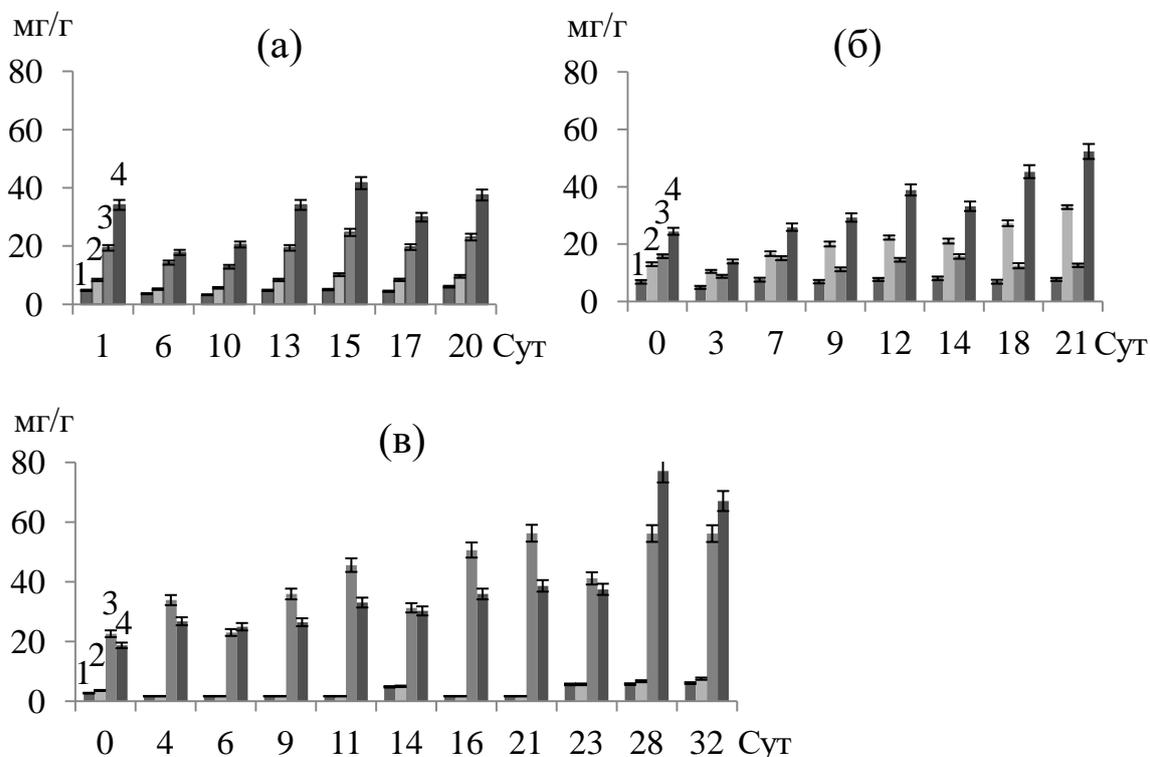


Рис. 3. Накопление дельтозида и протодиосцина и их (25S)-изомеров в цикле субкультивирования для разных линий штамма ИФР-ДМ-0,5 суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* при стандартном выращивании в колбах.

Обозначения: (а) – линия ДМ-0,5-К; (б) – линия 2У; (в) – линия 03;
1 – протодиосцин; **2** – (25S)-протодиосцин; **3** – дельтозид; **4** – (25S)-дельтозид

Для всех исследованных линий *D. deltoidea* можно отметить следующие закономерности образования стероидных гликозидов: повышение содержания (25S)-форм дельтозида и протодиосцина предшествует фазам активного роста клеток *in vitro*; культуры клеток постоянно синтезируют ФГ в течение цикла роста с некоторым усилением их накопления в конце стационарной фазы и начала деградации (рис. 2), в основном, за счет увеличения доли (25R)-форм дельтозида и протодиосцина (рис. 3).

Стабильность содержания стероидных гликозидов в культуре клеток *Dioscorea deltoidea* при поддержании в растущей коллекции и при хранении в криобанке

Хорошо известно, что после хранения при -196°C клетки *in vitro* полностью сохраняют характеристики исходного штамма (Попов и др., 1982; Волкова и др., 2015). Сопоставление восстановленной из криобанка культуры клеток с постоянно растущей в коллекции дает возможность корректно оценить изменения, произошедшие со штаммом при длительном выращивании в пересадочной культуре.

Исходя из вышесказанного следующим этапом работы было сопоставление ростовых и биосинтетических характеристик коллекционной линии штамма ИФР-ДМ-0,5, восстановленной после хранения в жидком азоте (закладка 1989 года) и растущей в пересадочной коллекции. Полученные результаты показали идентичность ростовых характеристик и жизнеспособности культуры (более 80%) при поддержании ее как в растущей коллекции, так и после хранения в криобанке. Анализ стероидных гликозидов показал более высокое содержание суммы ФГ в восстановленной культуре клеток (в среднем 11% от сухой массы клеток) по сравнению с выращиваемой в пересадочной коллекции (в среднем 7% от сухой массы клеток). Это свидетельствует о том, что содержание ФГ зависит от условий культивирования, то есть не является строго штаммоспецифичным признаком.

Для выявления закономерностей образования (25S)- и (25R)-форм гликозидов было проведено сопоставление содержания ФГ в биомассе, собранной на стационарной фазе роста (16-е сутки) как при длительном выращивании культуры в пересадочной коллекции, так и после ее восстановления из криобанка (табл. 1).

Важно отметить, что в линиях ДМ-0,5-К и 2У при длительном культивировании соотношение содержания (25R)-форм фураностаноловых гликозидов к содержанию их (25S)-изомеров постепенно снижается. Для коллекционной линии в 1982 году доля (25S)-гликозидов не превышала 5%, через 5 лет выращивания она увеличилась до 15%, а к настоящему времени составляет 30 – 50% от общего содержания ФГ. Полученные результаты подтверждают ранее сделанные предположения, что (25S)-форма ФГ в большей степени способствует пролиферации клеток, чем (25R)-форма,

и при длительном культивировании происходит автоселекция клеток *in vitro* по способности к накоплению (25S)-форм дельтозида и протодиосцина.

Таблица 1. Общее содержание фураностаноловых гликозидов (ФГ, мг/г сухой массы клеток) и соотношение их (25R)- и (25S)-форм (R : S) в биомассе культуры клеток *D. deltoidea* при поддержании в растущей коллекции и в криобанке

Год	ДМ-0,5-К		2У		03	
	ФГ	R : S	ФГ	R : S	ФГ	R : S
1982	58	22:1				
1987	42	7:1				
2007			112	13:1		
2008			98	4:1	82	1:1
2009	87	4:1	138	3:1	162	2:1
2011	70	1:1	121	3:1		
2015	58	2:1	114	4:1	113	2:1
2015. Циклы выращивания после криохранения	11	114	4:1			
	12	96	2:1			
	13	120	4:1			

Влияние метилжасмоната на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *Dioscorea deltoidea*

Известно, что метилжасмонат (МЖ) в большинстве случаев приводит к замедлению роста культур клеток *in vitro* и к существенной интенсификации образования многих вторичных метаболитов. Для культур клеток, образующих фураностаноловые гликозиды, МЖ можно использовать для доказательства корреляции ростовых процессов с биосинтезом ФГ.

Было установлено, что добавление МЖ в среду выращивания культуры клеток *D. deltoidea* линии ДМ-0,5-К, как и предполагалось, ухудшает ростовые характеристики культуры: индекс роста I снизился на 70 %, удельная скорость роста μ – на 30 % и накопление биомассы M_{max} упало на 70 %, при незначительном снижении жизнеспособности. Угнетение роста клеток *in vitro* сопровождалось существенным снижением и суммарного содержания ФГ в биомассе. Если

в контрольном варианте содержание ФГ на 14-е сутки культивирования составляло 78,6 мг/г от сухой биомассы, на 21-е сутки – 106,5 мг/г, то в ходе эксперимента на 14-е сутки – 70,8 мг/г, на 21-е сутки – 64,6 мг/г.

Влияние ингибиторов двух путей биосинтеза изопреноидов на физиологические и биосинтетические характеристики культуры клеток *Dioscorea deltoidea*

В целях изучения возможного взаимодействия двух путей синтеза изопреноидов (мевалонатного MVA и альтернативного MEP) при образовании ФГ был применен метод выращивания культуры клеток в питательных средах с добавлением специфичных ингибиторов этих путей: фосмидомицина (ингибитора пластидного MEP-пути синтеза) и мевинолина (ингибитора цитозольного MVA-пути).

Было показано, что оба ингибитора незначительно ухудшали рост культуры клеток *D. deltoidea* линии ДМ-0,5-К, но специфика их действия существенно отличалась. Действие мевинолина не изменяло характер роста культуры, что свидетельствует о его постоянном угнетающем влиянии на клетки *in vitro*. Фосмидомицин гораздо сильнее ингибировал рост культуры на начальных этапах, но затем наблюдалась резкая интенсификация ростовых процессов. Такое поведение характерно для относительно мощных, но быстро инактивирующихся ингибиторов.

Путем анализа общей скорости поглощения кислорода и вклада в этот процесс цианидрезистентного и цитохромного путей дыхания определили (рис. 4), что ингибиторы MVA- и MEP-путей синтеза изопреноидов вызывали состояние стресса в культивируемых клетках *D. deltoidea*, о чем можно судить по существенному увеличению доли цианидрезистентного дыхания. Однако специфика их влияния на физиологическое состояние клеток различна, о чем свидетельствует разная динамика соотношения вариантов дыхательного метаболизма в цикле выращивания клеток.

Кроме того, было установлено, что ингибиторы MEP- и MVA-путей синтеза изопреноидов по-разному влияют на образование стероидных гликозидов в культуре клеток *D. deltoidea* – если фосмидомицин увеличивает их общее содержание, то мевинолин – снижает. При продолжительной стационарной фазе наблюдали

значительное увеличение накопления (25R)-форм гликозидов, что, возможно, является ответной реакцией клеток на стресс, вызванный фосмидомицином (табл. 4).

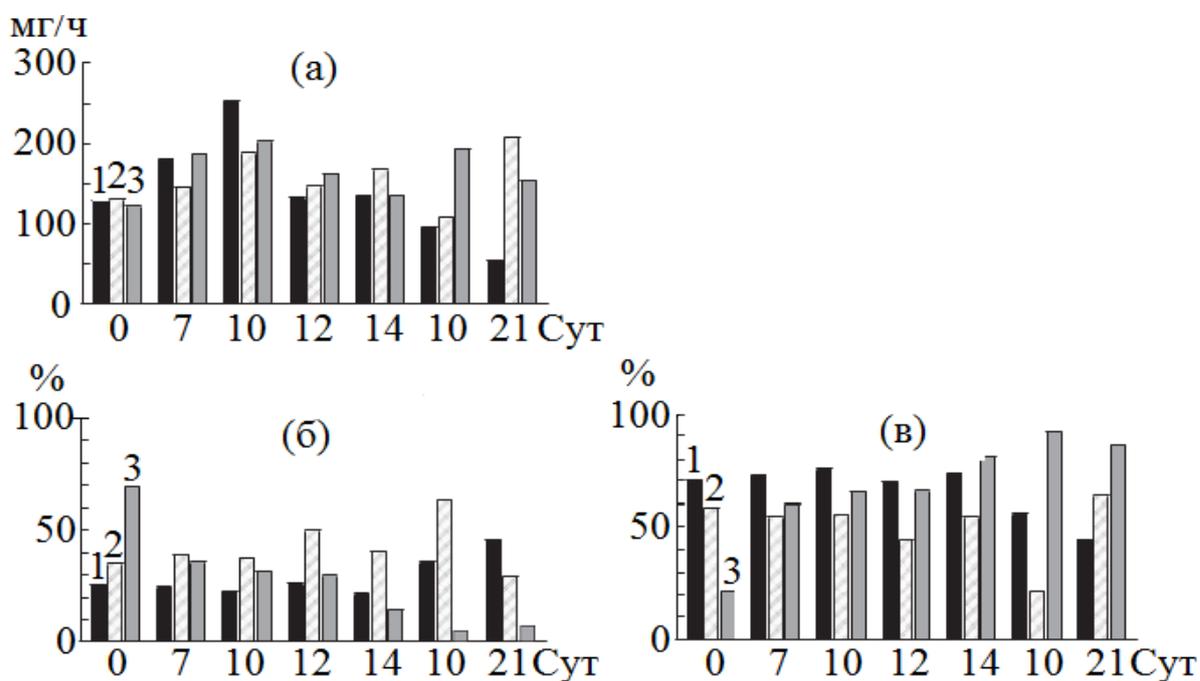


Рис. 4. Общая скорость поглощения кислорода мг/ч. (а) и вклад в нее цианидрезистентного (б) и цитохромного (в) дыхания культуры клеток *D. deltoidea* при выращивании на средах с ингибиторами двух путей биосинтеза изопреноидов.

Обозначения: а) – общая скорость поглощения кислорода, мг/ч.;

б) – цианидрезистентное дыхание, % от общей интенсивности дыхания;

в) – цитохромное дыхание, % от общей интенсивности дыхания;

1 – стандартная среда; 2 – среда с фосмидомицином; 3 – среда с мевинолином

Таблица 2. Суммарное накопление ФГ в суспензионной культуре клеток *D. deltoidea* при выращивании на стандартной питательной среде и на средах с добавлением фосмидомицина и мевинолина

Сутки культивирования	Суммарное накопление фураностаноловых гликозидов, мг/г сухой массы клеток		
	стандартная среда	среда с мевинолином	среда с фосмидомицином
7	76,9	59,5	48,0
14	46,4	71,1	51,0
21	84,4	167,4	56,3

Ростовые и биосинтетические характеристики разных линий суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* при выращивании в биореакторах

Следующим этапом, важным для создания биотехнологии получения биомассы культуры клеток, было изучение влияния системы культивирования (колбы – биореактор) на рост культуры клеток и образование ФГ. Было проведено выращивание клеток линий 2У и 03 в барботажных биореакторах в полупроточном режиме. Для линии 2У было показано снижение ростовых характеристик в новых условиях культивирования, что сопровождалось снижением общего содержания ФГ. Подобное явление наблюдалось ранее для данного типа биореакторов при культивировании коллекционного штамма ИФР-ДМ-0,5. Снижение содержания ФГ было обусловлено недостаточной степенью аэрации культуры и изменением дыхательного метаболизма клеток (Титова и др., 2015).

Для линии 03 было установлено, что она лучше адаптируется к аппаратурным условиям выращивания, ростовые характеристики и жизнеспособность культуры при выращивании в биореакторе мало отличались от таковых при выращивании в колбах (накопление биомассы составляло в обоих случаях около 7 г/л). При этом происходило постепенное повышение содержания ФГ с 6% от сухой биомассы в первом цикле культивирования до 10 % – в третьем цикле, что сопровождалось интенсификацией роста (рис. 5)

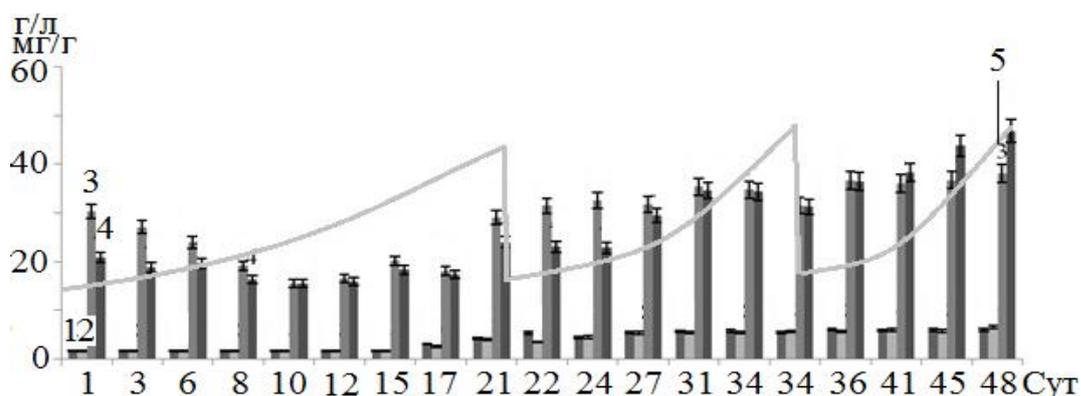


Рис. 5. Содержание дельтозида и протодиосцина и их (25S)-изомеров в биомассе суспензионной культуры *D. deltoidea* штамма ИФР-ДМ-0,5 в первых трех циклах субкультивирования в биореакторе.

Обозначения: 1 – протодиосцин, мг/г; 2 – (25S)-протодиосцин, мг/г;
3 – дельтозид, мг/г; 4 – (25S)-дельтозид, мг/г; 5 – сухая масса клеток, (г/л)/6

В целом, как показали результаты, обе линии могут быть успешно адаптированы к аппаратурному выращиванию, однако в каждом случае требуется оптимизация условий культивирования.

Особенности образования стероидных гликозидов в культурах клеток *Tribulus terrestris* L. и *Trigonella foenum-graecum* L.

На основе изучения закономерностей образования стероидных гликозидов в культурах клеток диоскореи была выдвинута гипотеза, что в клетках *in vitro* образуются преимущественно соединения, способствующие пролиферации клеток, а в процессе длительного субкультивирования происходит автоселекция клеток, содержащих подобные вещества. Однако эта гипотеза требует проверки и более серьезных доказательств с использованием культур клеток других видов растений.

Задачей второго блока экспериментов явилось получение культур клеток растений, синтезирующих стероидные гликозиды, – якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. и пажитника греческого *Trigonella foenum-graecum* L. – и исследование их ростовых и биосинтетических характеристик.

Для получения культуры клеток якорцев стелющихся в качестве эксплантов были использованы семена. Исследовали 9 вариантов сред, отличающихся между собой по гормональному составу. Было установлено, что каллусные культуры формируются только на среде, содержащей 2,4Д и БАП. Для получения суспензионных культур клеток полученные каллусы переводили в жидкую среду того же состава (без добавления агара). В результате получили суспензионную культуру клеток *T. terrestris* с высокими показателями роста ($M_{max} = 13$ г/л, $I = 8,6$, $\mu = 0,24$ сут.⁻¹, $Y = 0,4$, $P = 1$ г/л/сут.). Мониторинг в течение двух лет культивирования суспензионной культуры клеток *T. terrestris* показал существенное (в среднем на 20-30%) улучшение ростовых характеристик (увеличились I , μ , M_{max} , Y , P , снизилось τ). Полученные результаты хорошо согласуются с основным принципом популяционного контроля развития – отбором клеток по максимальной пролиферативной активности.

Полученную культуру клеток *T. terrestris* выращивали в барботажном биореакторе, в результате установили, что смена способа культивирования (колбы – биореактор) положительно сказывается на ее ростовых характеристиках.

В качестве экспланта для получения суспензионной культуры клеток пажитника греческого *Trigonella foenum-graecum* использовали линию гетеротрофного каллуса листового происхождения (Юрин и др., 2009). Суспензионную культуру пажитника получили на среде с 2,4-Д и кинетином. В течение двухлетнего выращивания выявлено, что полученная суспензионная культура клеток хорошо оптимизирована по ростовым характеристикам ($M_{max}=9,4$ г/л, $I=5,5$, $\mu=0,22$ сут.⁻¹, $Y=0,26$, $P=0,52$ г/л/сут.).

Образование стероидных гликозидов в культуре клеток *Tribulus terrestris* и *Trigonella foenum-graecum*

Основной задачей данного этапа работы явилось изучение образования стероидных гликозидов в полученных суспензионных культурах клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* с момента получения и последующих двух лет культивирования.

ТСХ анализ биомассы суспензионных культур клеток как *T. terrestris*, так и *T. foenum-graecum* непосредственно после их получения показал отсутствие как спиростаноловых, так и фуростаноловых гликозидов. Однако повторный анализ через полгода выращивания этих культур клеток показал наличие ФГ в биомассе обеих культур. Важно, что на протяжении последующих 6 месяцев выращивания культуры клеток *T. terrestris* содержание ФГ в клетках увеличилось более чем в полтора раза (табл. 3), что подтверждает гипотезу об автоселекции клеток, содержащих эти соединения.

Таблица 3. Количественное содержание фуростаноловых гликозидов в биомассе суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* в различных циклах выращивания

Данные образца	Количество ФГ, мг/г сухой массы клеток
Цикл в октябре 2015 г.	0,77
Цикл в ноябре 2015 г.	0,86
Цикл в феврале 2016 г.	1,02
Цикл в феврале 2016 г.	1,04
Цикл в марте 2016 г.	1,15

В культуре клеток *T. foenum-graecum* образование ФГ также сохранялось в течение дальнейшего выращивания, однако их содержание находится за пределами чувствительности спектрофотометрического метода анализа (ниже 0,01 мг/г).

Влияние синтетических ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток *Tribulus terrestris*, *Trigonella foenum-graecum* и *Dioscorea deltoidea*

Из данных литературы известно, что замена в среде выращивания синтетического ауксина 2,4Д на НУК приводит к изменению степени дифференцировки клеток, некоторому замедлению их роста и к существенной интенсификации синтеза тритерпеновых гликозидов (Смоленская и др., 2007).

Суспензионные культуры клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* пересаживали на питательные среды, в которых 2,4Д был заменен на НУК, а культуру клеток *T. terrestris* – дополнительно на среды, содержащие оба ауксина (2,4-Д, НУК). В качестве контроля использовали культуры клеток, выращиваемые на средах с 2,4-Д.

Для культуры клеток *T. terrestris*, растущей в среде с НУК, наблюдали образование крупных, плотных клеточных агрегатов, увеличение количества аномальных клеток и сильное падение жизнеспособности культуры в третьем цикле выращивания. На среде с комбинацией 2,4-Д и НУК рост культуры клеток *T. terrestris* оказался сопоставимым с контролем, что, очевидно, связано с наличием 2,4-Д в питательной среде. В этом варианте среды также наблюдали повышение агрегированности культуры клеток, но при этом культура клеток сохраняла высокую жизнеспособность (80-90%) и удовлетворительные ростовые характеристики.

В биомассе культуры клеток *T. terrestris*, выращенной во всех вариантах сред, был проведен анализ количественного содержания стероидных гликозидов. Установлено, что замена ауксинов в среде привела к существенной интенсификации образования фураностаноловых гликозидов в этой культуре. В клетках *in vitro*, выращиваемых на средах с НУК и БАП, уже к 7-м суткам 1-го цикла выращивания было зафиксировано увеличение содержания ФГ в 3 раза (3,41 мг/г), а на 14-е сутки – в 6,6 раза – (6,79 мг/г) по сравнению с контролем (1,02 мг/г). При дальнейшем

выращивании культуры (в течение 2-го и 3-го цикла культивирования) содержание ФГ снижалось, хотя оставалось в 1,3-1,6 раза выше, чем в контроле (табл. 4).

В клетках *T. terrestris*, выращенных на среде с 2,4-Д, НУК и БАП, также было отмечено повышение содержания фураностаноловых гликозидов, однако увеличение их содержания в 1,5 раза (1,75 мг/г по сравнению с 1,02 мг/г в контрольном варианте) было зафиксировано лишь к 14-м суткам 1-го цикла выращивания. Максимальное повышение содержания ФГ наблюдали на 14-е сутки 2-го цикла выращивания (2,88 мг/г). В дальнейшем их содержание в биомассе немного снижалось, но оставалось в 2 раза больше, чем в контрольной культуре клеток.

Таблица 4. Количественное содержание ФГ в биомассе суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris*, выращенной в различных вариантах сред

Вариант экстракта биомассы культуры клеток <i>T. terrestris</i>	Содержание ФГ, мг/г сухой массы
Контроль, 14-е сутки, 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л БАП	1,02
1-й цикл, 7-е сутки, 2 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	3,41
1-й цикл, 14-е сутки, 2 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	6,79
2-й цикл, 14-е сутки, 2 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	1,59
3-й цикл, 14-е сутки, 2 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	1,31
1-й цикл, 7-е сутки, 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	0,99
1-й цикл, 14-е сутки, 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	1,75
2-й цикл, 14-е сутки, 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	2,88
3-й цикл, 14-е сутки 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП	1,93

Для суспензионной культуры клеток пажитника греческого, выращенной на среде с НУК и кинетином, были зафиксированы результаты, в целом аналогичные полученным для культуры клеток *T. terrestris*. Уже на 7-е сутки 1-го цикла выращивания культуры клеток *T. foenum-graecum* на среде с НУК произошло увеличение содержания ФГ в клетках почти в полтора раза (1,17 мг/г). Этот уровень содержания ФГ сохранялся при дальнейшем культивировании клеток. К третьему циклу выращивания культуры клеток *T. foenum-graecum* на среде с НУК рост клеток прекращался и наблюдалась гибель клеток.

При выращивании культуры клеток *Dioscorea deltoidea* на средах с НУК и кинетином, в отличие от культур клеток якорцев стелющихся и пажитника греческого, не было отмечено изменения ростовых и биосинтетических

характеристик по сравнению с контрольным вариантом, выращиваемым на среде с 2,4-Д. Подобный результат может свидетельствовать о том, что влияние регуляторов роста на образование стероидных гликозидов зависит не только от специфики используемого соединения, но и от характеристик культуры клеток. В частности, суспензионная культура клеток *D. deltoidea* является стабильной, устойчивой, истинно дедифференцированной культурой клеток с высоким уровнем синтеза ФГ. В этом случае смена в среде регуляторов роста ауксиновой природы не приводит к существенным изменениям ростовых и биосинтетических характеристик клеток *in vitro*.

Идентификация стероидных гликозидов культуры клеток *Tribulus terrestris*

Методом УЭЖХ МС были идентифицированы 10 соединений, относящихся к фураностаноловым гликозидам (рис. 6, 7). Для суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращиваемой на стандартной среде, содержащей 2,4-Д и БАП, показано наличие пика только одного основного соединения с гитогенином в качестве агликона. Для культуры клеток, которую выращивали в среде с НУК и БАП, отмечено наличие от 2 до 10 фураностаноловых гликозидов, при этом наблюдается присутствие 4 пар 25-R- и 25-S-изомеров агликонов (гитогенин/неогитогенин, тигогенин/неотигогенин).

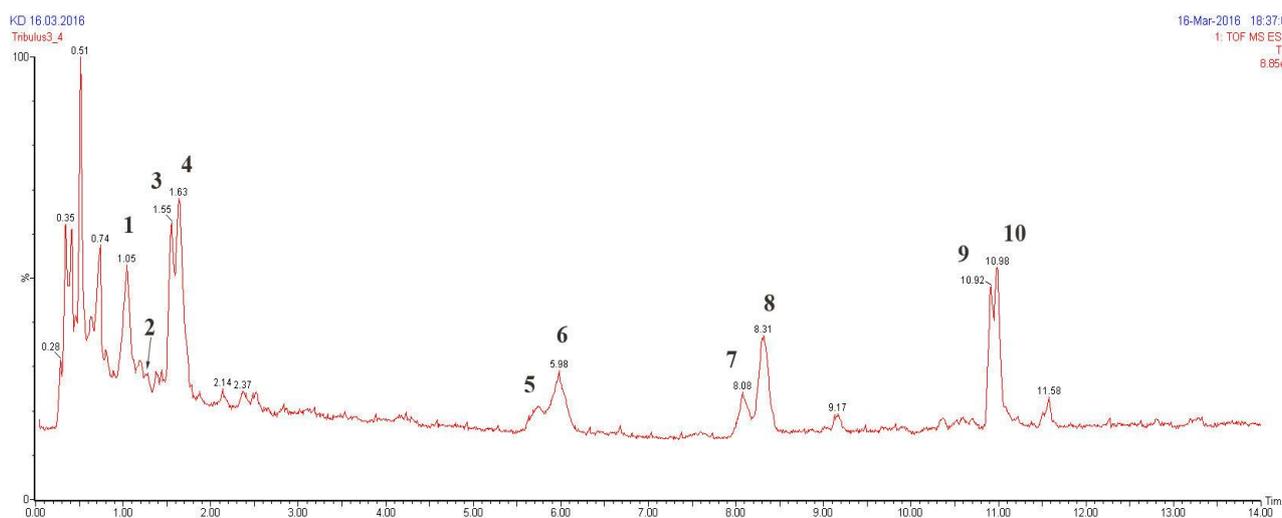


Рис. 6. Хроматографический профиль фураностаноловых гликозидов в экстракте из биомассы культуры клеток *T. terrestris*, полученный при проведении UPLC ESI MS. Цифрами (1 – 10) обозначены пики идентифицированных гликозидов.

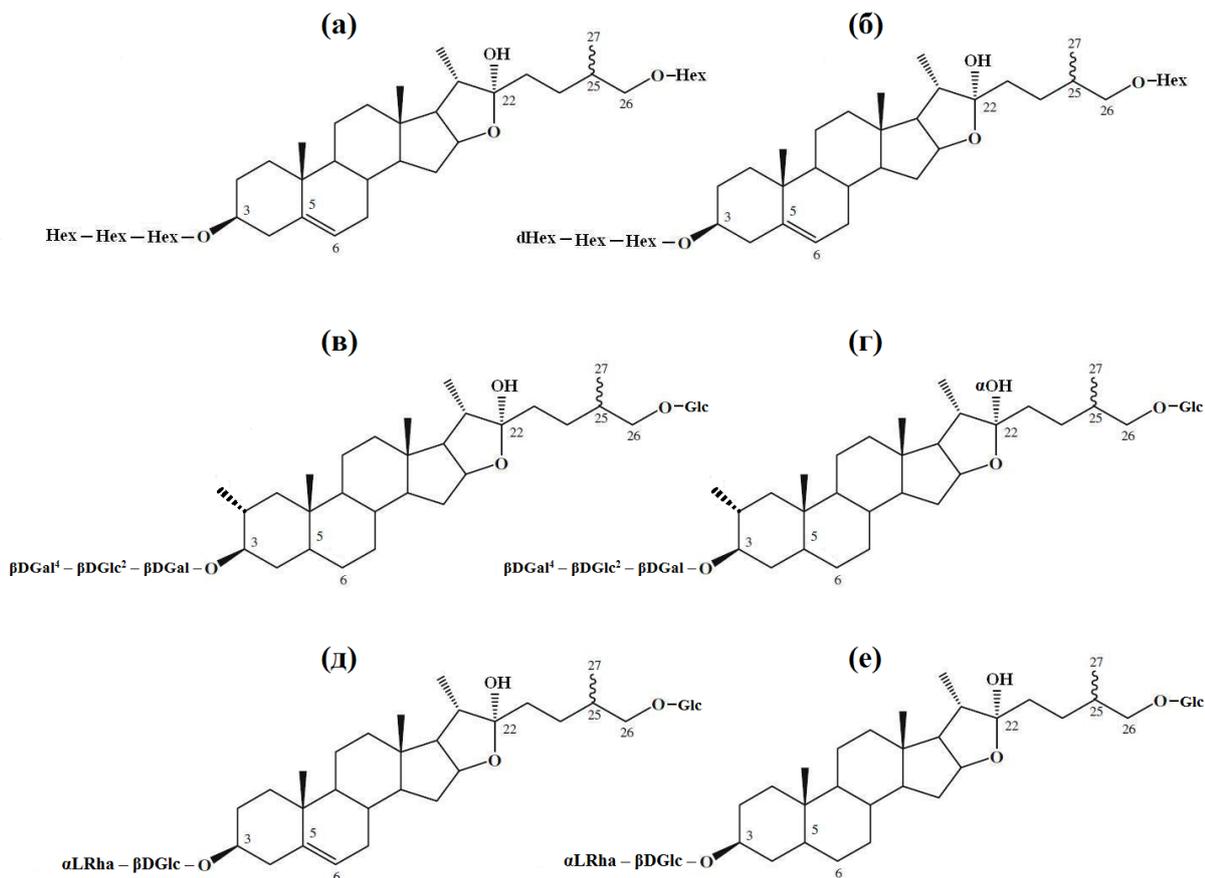


Рис.7. Структуры основных идентифицированных стероидных гликозидов культуры клеток *T. terrestris*.

Обозначения: (а) – Hex-Hex-Hex-O-3-(ОН-диосгенин)-O-26-Hex;

(б) – dHex-Hex-Hex-O-3-(ОН-диосгенин)-O-26-Hex; (в) – террестрозин G;

(г) – террестрозин H; (д) – (25R)-тригонеозид XII; (е) – (25R)-тригонеозид III

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения трех линий культуры клеток *D. deltoidea* было установлено, что качественный состав образуемых клетками *in vitro* стероидных гликозидов стабилен и является штаммовзависимым признаком, тогда как количество и соотношение индивидуальных соединений зависит от используемой линии и условий выращивания. Анализ накопления фураностаноловых гликозидов (ФГ) в клетках *in vitro* в цикле выращивания культур, а также в экспериментах с использованием регуляторов роста и ингибиторов изопреноидного синтеза, позволил установить положительную корреляцию их образования с интенсивностью роста культур, что отражает функциональную роль этих соединения для

пролиферации клеток. Мониторинг содержания ФГ при длительном выращивании линий, а также сопоставление с их содержанием в культурах, восстановленных после криоконсервации, показал повышение доли (25S)-изомеров в процессе субкультивирования, что свидетельствует о том, что (25S)-гликозиды, в отличие от (25R)-форм, в большей степени способствуют пролиферации клеток *in vitro*.

Выявленные особенности накопления ФГ в культивируемых клетках существенно отличают эти вторичные метаболиты от других соединений специализированного обмена изопреноидов, для которых неоднократно описан реципрокный характер взаимосвязи процессов их накопления и пролиферации клеток.

Для «молодых» культур клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* зафиксировано появление ФГ и постепенное увеличение их содержания в процессе субкультивирования. Это подтверждает сделанные ранее предположения о закономерностях образования стероидных гликозидов в клетках *in vitro*, а именно: а) в культурах клеток образуются фуростаноловые, но не спиростаноловые гликозиды; б) происходит автоселекция клеток, образующих ФГ, поскольку эта форма стероидных гликозидов может способствовать пролиферации клеток.

Изучение динамики образования стероидных гликозидов в культуре клеток *T. terrestris* позволило оценить скорость этого процесса – за полгода выращивания содержание ФГ увеличилось в 1,5 раза. До этого закономерности автоселекции клеток по содержанию ФГ не были выявлены – фитохимическое исследование культур клеток *D. deltoidea* были начаты только спустя 8-10 лет после получения культур.

Для культур клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* замена состава ауксинов в среде выращивания (2,4Д на НУК) вызывала быструю активацию и повышение синтеза стероидных гликозидов, но приводила к увеличению агрегированности клеток и, впоследствии, к гибели культуры. Путем комбинирования сочетания регуляторов роста (2,4Д и НУК) оказалось возможным добиться образования стероидных гликозидов и удовлетворительных ростовых характеристик культуры. Важно отметить, что изменение состава гормонов приводит к изменению не только количества стероидных гликозидов, но и их качественного состава.

Можно предположить, что НУК выполняет роль сигнальной молекулы, которая способна приводить к быстрой стимуляции синтеза вторичных метаболитов и параллельно вызывать дифференцировку клеток. Однако сигнальное действие НУК существенно зависит от физиологических характеристик используемой культуры клеток – в случае стабильных культур с высоким уровнем синтеза стероидных гликозидов ее использование может быть неэффективно. Ранее сигнальное действие НУК было показано для синтеза тритерпеновых гликозидов женьшеня, однако с несколько иной динамикой.

Таким образом, стероидные гликозиды ряда фуростана можно отнести к особой группе изопреноидов, способствующей пролиферативной активности клеток высших растений, что обуславливает их высокое стабильное содержание в популяциях дедифференцированных растительных клеток *in vitro*.

ВЫВОДЫ

1. Все линии штамма ИФР-ДМ-0,5 культуры клеток *D. deltoidea* содержат протодиосцин, дельтозид и их (25S)-изомеры. Количественное содержание этих соединений и ее стабильность зависят как от условий выращивания, так и от характеристик линии и может изменяться в 2-6 раз.

2. В процессе длительного выращивания культур клеток *D. deltoidea* происходит увеличение образования (25S)-изомеров протодиосцина и дельтозида. Вероятно, (25S)-соединения в большей степени способствуют пролиферации клеток, чем их (25R)-формы, и при длительном культивировании происходит автоселекция образующих их клеток.

3. Метилжасмонат приводит к ухудшению роста культуры клеток *D. deltoidea* и снижению образования ФГ, что подтверждает взаимосвязь накопления ФГ и пролиферативной активности клеток.

4. Ингибитор MVA-пути – мевинолин не значительно влияет на рост культуры клеток *D. deltoidea*, что свидетельствует о высокой вероятности выхода изопентенилдифосфата из пластид в цитозоль. Фосмидомицин ингибирует рост

культуры в его начальные фазы, что говорит об отсутствии или ограничении обратного потока интермедиатов образования изопреноидов из цитозоля в пластиды.

5. При длительном выращивании суспензионных культур клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* появляется и увеличивается содержание ФГ, способствующих пролиферации клеток. Это подтверждает гипотезу об автоселекции клеток с повышенным содержанием веществ, способствующих их размножению.

6. Для культур клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum* изменение состава ауксинов в среде приводит к быстрому повышению уровня накопления ФГ и к увеличению их разнообразия. Идентифицированы гликозиды, содержащиеся в качестве агликонов (25R)- и (25S)-изомеры диосгенина, гитогенина и тигогенина. Интенсификация образования ФГ коррелирует с их агрегированностью и снижением жизнеспособности культуры.

7. Замена ауксинов в среде культивирования способна сильно изменять ростовые и биосинтетические характеристики у «молодых» суспензионных культур клеток (1-2 года после получения – культуры клеток *T. terrestris* и *T. foenum-graecum*), но практически не влияет на рост и образование стероидных гликозидов в стабильной, длительно выращиваемой суспензионной культуре клеток *D. deltoidea*.

8. На культурах клеток трёх видов растений подтверждены общие закономерности образования стероидных гликозидов в клетках *in vitro*: образование фураностаноловых, но не спиростаноловых гликозидов, постепенное повышение их содержания за счет автоселекции клеток, возможность значительной интенсификации синтеза и накопления в клетках путем гормонального воздействия. Полученные результаты важны для понимания общих механизмов образования вторичных метаболитов в клетках растений *in vitro* и *in vivo* и свидетельствуют о наличии нескольких механизмов регулирования образования этих соединений, а также о возможности их совместного функционирования.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК

1. Кочкин Д.В., Ханды М.Т., Зайцев Г.П., Толкачева Н.В., Шашков А.С. Титова М.В., Чирва В.Я., Носов А.М. (2016) Протодиосцин в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea*. *Химия природных соединений*, 52, 572–576.
2. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Суханова Е.С., Ключин А.Г., Иванов И.М., Носов А.М. (2016) Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. – продуцентов стероидных гликозидов. *Биотехнология*, 32, 21–30.
3. Ханды М.Т., Титова М.В., Константинова С.В., Кочкин Д.В., Иванов И.М., Носов А.М. (2016) Особенности накопления изомеров протодиосцина и дельтозида в клетках диоскореи дельтовидной при глубинном культивировании в различных системах. *Прикладная биохимия и микробиология*, 52, 614–620.
4. Титова М.В., Ханды М.Т., Константинова С.В., Куличенко И.Е., Суханова Е.С., Кочкин Д.В., Носов А.М. (2016) Влияние ингибиторов двух путей биосинтеза изопреноидов на физиологические и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. *Физиология растений*, 63, 908-914.

В прочих изданиях

1. Ханды М.Т., Овсиенко М.В., Кочкин Д.В. (2012) Влияние жасминовой кислоты на две линии культуры клеток женьшеня. *Сб. материалов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012»*, М.: МГУ, с. 240–241.
2. Ханды М.Т., Суханова Е.С. (2014) Получение каллусных и суспензионных культур клеток *Tribulus terrestris* L. *Сб. материалов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014»*, М.: МГУ, с. 308.

3. Ханды М.Т., Титова М.В., Константинова С.В., Кочкин Д.В., Носов А.М. (2015) Изменение содержания стероидных гликозидов в клетках диоскореи дельтовидной *in vitro* при выращивании культуры в полупроточном режиме. Сб. тезисов докладов *Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий»*, Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с. 559.
4. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Суханова Е.С., Иванов И.М., Носов А.М. (2015) Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток *Tribulus terrestris* L. Сб. тезисов *Научной конференции и школы для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений»*. М.: ИФР РАН, с. 686.
5. Ханды М.Т., Томилова С.В., Кочкин Д.В., Иванов И.М., Носов А.М. (2016) Влияние синтетических ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток якорцев стелющихся и пажитника греческого. Сб. тезисов *Научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма»*. *Годичное собрание ОФР*, С-Пб.: СПбГУ, с.142.