

На правах рукописи



ПРОКОФЬЕВА

Мария Юрьевна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ «ИСКУССТВЕННЫХ СЕМЯН»
В ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*
КОРНЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в группе специализированного метаболизма корней Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Кузовкина Инна Николаевна

Официальные оппоненты:

Носов Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, кафедра физиологии растений, биологический факультет, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, профессор кафедры

Слепян Лариса Ивановна, кандидат биологических наук, кафедра промышленной технологии лекарственных препаратов, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Санкт-Петербург, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, агрономический факультет, г. Москва

Защита состоится «27» ноября 2012 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.

Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва.

Автореферат диссертации размещен на сайтах ВАК РФ и www.ippras.ru

Автореферат разослан «26» октября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Агробактериальная трансформация растительного материала позволила преодолеть значительные трудности в культивировании растительных органов в условиях *in vitro*. Так, метод культивирования изолированно растущих корней растений с середины 80-х годов XX века был обогащен использованием целенаправленной генетической трансформации растительных клеток с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* (Chilton et al., 1982). Это позволило получать корневые культуры, способные к росту в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах и к биосинтезу вторичных метаболитов, типичных для корней проростков или интактных исходных растений (Terfer, 1990). Генетически трансформированные корни послужили основой для разработки перспективной технологии биотехнологического получения вторичных метаболитов, таких как алкалоиды, фенольные соединения и ряд других (Flores & Filner 1985; Hamill et al., 1987; Giri & Narasu, 2000; Oksman-Caldentey & Arroo, 2000; Georgiev et al., 2010). Реализация метода трансформации растительного материала с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* сотрудниками Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН привела в 1999 году к созданию коллекции генетически трансформированных корней (КГТК), которая к настоящему времени насчитывает около 40 штаммов корневых культур, полученных от 29 видов растений, относящихся к 13 семействам. Наибольшую часть коллекции составляют корни ценных лекарственных растений, в которых биосинтез физиологически активных вторичных соединений локализован в подземной части. Биохимический анализ основных штаммов корневых культур показал, что корни в условиях *in vitro* сохраняют способность к образованию корнеспецифичных низкомолекулярных метаболитов на уровне, сопоставимом с их содержанием в корнях целых или ювенильных растений. Эта особенность делает привлекательным их применение при исследовании пространственной и временной организации вторичного метаболизма в корнях растений (Kuzovkina et al., 2004; Thorpe, 2007). Различные способы культивирования корней (пролонгированное выращивание, действие стрессовых факторов, использование предшественников биосинтеза конечных продуктов) позволяют увеличивать содержание в них ценных вторичных метаболитов до уровня, сравнимого с их концентрациями в корнях целого растения. Однако давно обсуждаемой в ряде публикаций проблемой является высокая вероятность

неконтролируемого инфицирования культур растительных тканей и органов, выращиваемых в условиях *in vitro* (Leifert & Cassells, 2001; Bunn, 2002). Собственный опыт работы с объектами коллекции генетически трансформированных корней различных видов растений показал возможность неожиданного проявления, в основном, бактериальной инфекции. Для элиминирования спонтанно проявляющейся бактериальной инфекции обычной практикой является добавление антибиотика в культуральные питательные среды, что не всегда бывает эффективным и лишь на время снижает интенсивность нежелательной контаминации (Leifert et al., 1994). Кроме того, антибиотик в ряде случаев ингибирует рост растительных клеток, что может привести к гибели ценных корневых культур.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось совершенствование техники культивирования генетически трансформированных корней ценных растений с помощью метода так называемых «искусственных семян» (ИС) для оздоровления и получения стабильно растущих корневых культур, а также для их сохранения и снижения экономических затрат при поддержании коллекционного материала.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить «искусственные семена» из корневых фрагментов ряда растений методом их инкапсулирования в гелевую оболочку и подобрать оптимальные условия для сохранения их жизнеспособности.
2. Исследовать влияние инкапсулирования на физиологические параметры корневых культур, возобновленных из «искусственных семян».
3. Разработать метод элиминирования (удаления) спонтанной бактериальной инфекции в культуре генетически трансформированных корней с помощью «искусственных семян».

Научная новизна. В работе впервые применен метод ИС для сохранения генетически трансформированных корневых культур в инкапсулированном состоянии при пониженной положительной температуре в условиях *in vitro*. Дана статистическая оценка жизнеспособности инкапсулированных корневых фрагментов, а также оценка физиологического состояния линий корневых культур некоторых видов растений, а именно *Ruta graveolens*, *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea*, возобновленных из ИС. Впервые выявлены и охарактеризованы физиологические изменения, возникающие при выращивании в условиях освещения линий корневых культур *Ruta graveolens* и

Scutellaria baicalensis после их длительной низкотемпературной иммобилизации в виде ИС. Разработан метод эффективного оздоровления корневых культур, подверженных бактериальному инфицированию.

Научно-практическое значение. Разработанный метод длительного сохранения инкапсулированных корневых фрагментов в виде ИС вносит существенный вклад в технологию культивирования генетически трансформированных корней как в лабораторных условиях, так и при переходе к крупномасштабному выращиванию корней лекарственных растений. Длительное сохранение ростовой активности ИС, полученных из корневых культур ценных лекарственных растений, позволяет использовать их в качестве резервного фонда, а также, в случае необходимости, как компактно упакованные стерильные корневые экспланты для транспортировки растительного материала на дальние расстояния. Новый способ оздоровления инфицированных корневых культур с помощью ИС позволяет существенно снизить риск потери ценных линий корневых культур и сохранить их продуктивность в течение многих лет выращивания. Выявленные физиологические и биохимические особенности корневых культур, возобновленных из ИС, рекомендуется учитывать при выборе условий последующего культивирования корней лекарственных растений. Метод альгинатного инкапсулирования способен дополнить и усовершенствовать технику сохранения растительных ресурсов. Полученные данные могут быть включены в материалы лекций по физиологии растений.

Апробация работы. Материалы данной работы представлены на IX Международной Конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2007), на 2-м Всероссийском симпозиуме «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности» (Москва, 2007), на Симпозиуме «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств» (Москва, 2008), на IX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008), на Германо-Российском форуме по биотехнологии (Новосибирск, 2009), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010), на 15-й Зимней студенческой школе «Биология растительной клетки» (Суздаль, 2011), на VII Съезде общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, 1 патент и 1 публикация в книге.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа содержит 7 таблиц и 34 рисунка. Список литературы включает 251 источник, в том числе 229 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. В качестве растительного материала для приготовления «искусственных семян» использовали фрагменты корней, полученных в результате генетической трансформации стерильных проростков растений с помощью T-ДНК Ri-плазмиды диких (не модифицированных) штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* (Кузовкина и др., 2001). Основными объектами исследования были культуры трансформированных корней трех видов лекарственных растений – руты душистой (*Ruta graveolens* L.), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), которые относятся к семействам *Rutaceae*, *Lamiaceae* и *Crassulaceae* соответственно.

Инкапсулирование корневых фрагментов. В основу метода получения «искусственных семян» (далее ИС) путем инкапсулирования фрагментов генетически трансформированных корней легли приемы, описанные в работах японских исследователей (Uozumi et al., 1994; Honda, 2001). Все операции осуществляли в стерильных условиях. При проведении работы использовали корневые культуры разного возраста (2- и 4-недельные). Для получения ИС использовали гелеподобный матрикс, который представлял собой раствор Na-альгината (Roth, Германия), приготовленный на основе безгормональных питательных сред Гамборга (B5), Стрита (S) и Мурасиге и Скуга с уменьшенным вдвое содержанием азота ($1/2$ МС). Апикальные участки корней (2-3 см) нарезали вручную острым ланцетом на фрагменты длиной 2-3 мм, которые затем смешивали с раствором Na-альгината. Для закрепления геля и образования капсул использовали 70 мМ раствор CaCl_2 (Merck, Германия), в который при помощи автоматической пипетки с диаметром наконечника около 3 мм по каплям добавляли гелевую суспензию корневых фрагментов. Количество полученных таким путем ИС составляло 250-300 шт. ИС помещали в стерильные чашки Петри для

хранения в условиях низкой положительной температуры (4°C), обеспечивая таким образом иммобилизацию корневых фрагментов.

«Проращивание» ИС и получение из них линий корневых культур. Жизнеспособность инкапсулированных корневых фрагментов, выдержанных при 4°C, определяли как «всхожесть» ИС, которую проверяли путем их «проращивания» в условиях, обычных для культивирования генетически трансформированных корней, после различных сроков хранения, и результаты выражали в процентах. Для «проращивания» ИС переносили на агаризованную питательную среду в чашки Петри, которые помещали в темноту в термостатируемые условия (25±2°C).

После прорастания апексов корневых фрагментов через оболочку ИС, кончики корней размером 1,5–2 см отделяли и помещали в колбы с жидкой питательной средой по 8–10 корневых кончиков на 40 мл среды. Полученные из ИС линии корневых культур выращивали в обычных для них условиях (при температуре 25±2°C в темноте, при постоянном качании 90 об./мин) до образования хорошо растущей массы корней. В конце пассажа проводили оценку физиологических параметров культур (ростовой активности корней, содержания в них сухого вещества, электропроводности и рН культуральных сред), а также тестировали их на наличие инфекции. При проведении каждого эксперимента число повторностей в опытном варианте было пятикратным. Каждый из экспериментов повторяли, по меньшей мере, трехкратно, так как в ряде случаев наблюдались некоторые отклонения, связанные с изменяющимися условиями культивирования корней.

Исследование влияния света на корневые фрагменты при прорастании ИС. Часть прорастающих из ИС корневых фрагментов исследуемых культур помещали в термостатируемую световую камеру, оборудованную люминесцентными лампами дневного света (FT8 30W/33/cool light, Camelion, Китай), с уровнем освещения 30–35 мкЕ/м²·с в области ФАР и фотопериодом 18/6 ч (свет/темнота).

При регенерации зеленых побегов, наблюдавшейся в результате проращивания ИС *Ruta graveolens* в условиях освещения, получение корнесобственных растений проводили на питательной среде Гамборга, содержавшей 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК, Sigma, США) и уменьшенную концентрацию сахарозы (0,2%), с последующим переносом их в почвенный субстрат и адаптацией к условиям *in vivo* (Bohidar, 2008).

В случае получения из ИС *Scutellaria baicalensis* линий корневых культур, зеленеющих в условиях освещения, исследовали поперечные тонкие срезы зеленых участков корней с помощью световой микроскопии, спектрофотометрически определяли содержание и соотношение хлорофилла *a* и *b* в корнях (Wintermans & De Motts, 1965), а также измеряли их фотосинтетическую активность методом регистрации индукции флуоресценции хлорофилла с помощью портативного флуориметра PAR-FluorPen FP 100-MAX-LM (PSI, Чехия) (Корнеев, 2002). Кроме того, проводили сравнительный анализ содержания флавонов в возобновленных из ИС линиях корневых культур *Scutellaria baicalensis*, выращенных в условиях освещения и в темноте. Содержание флавонов в корнях *Scutellaria baicalensis*, определяли с помощью аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ. Для химического анализа использовали метанольные экстракты лиофильно высушенных и тщательно измельченных корней (Кузовкина и др., 2005). Концентрацию отдельных флавонов в экстрактах рассчитывали по площадям пиков на основании калибровочных кривых, построенных для стандартов байкалина и байкалеина (Sigma-Aldrich, США) с применением программы OriginPro7.0. Окончательный расчет содержания каждого из флавонов (в мг на г сухих корней) и их суммарного содержания проводили с учетом навески растительного материала, объема растворителя и разведения экстракта, использованных при проведении анализа. Каждое определение проводили в двух биологических и двух химических повторностях.

Элиминирование бактериальной инфекции. Элиминирование внезапно проявлявшейся бактериальной инфекции в корневых культурах *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea* проводили с помощью инкапсулирования инфицированных корневых фрагментов с добавлением в гелевый матрикс антибиотика клафоран (Cefotaxime, Aventis Pharma, Великобритания) в концентрации 300-600 мг/л, с последующим выдерживанием ИС в условиях пониженной температуры в течение 2-12 недель. Тестирование корневых культур на контаминацию осуществляли путем отбора проб культуральных сред с последующим инкубированием их на селективной среде для бактерий (УЕВ) при температуре 33°C с целью возможного выявления бактериальных колоний.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки результатов был использован пакет анализа программы Microsoft Office Excel 2010. Для каждой

группы данных определяли среднее значение, ошибку среднего и стандартное отклонение. В таблицах приведены данные в виде средних арифметических значений со стандартным отклонением, на рисунках – в виде средних арифметических с двусторонним доверительным интервалом ($P = 0,95$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Морфологическая характеристика генетически трансформированных корневых культур *Ruta graveolens*, *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea*. Для апробации сохранения корневых культур коллекции с помощью метода ИС (с целью создания запасной культуры – *stock culture*) было необходимо изучить влияние инкапсуляции корневых фрагментов на ростовые и физиологические показатели возобновленных из них изолированно растущих корней растений, относящихся к разным семействам и имеющих морфологические и биохимические различия, что и объясняет выбор растительных объектов в данной работе.

Исследуемые культуры изолированно растущих корней трех видов растений (*Ruta graveolens*, *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea*) проявляют все морфологические особенности, характерные для pRi T-ДНК трансформированных корней. Так, помимо быстрого роста корневых культур на безгормональных питательных средах, одним из основных признаков успешного проведения трансформации является утрата геотропической ориентации корней и проявление у них плагиотропного роста (рис. 1).



Рис. 1. Культуры pRi T-ДНК трансформированных корней:
а - *Ruta graveolens*, *б* - *Scutellaria baicalensis*, *в* - *Rhodiola rosea*.

Параллельно с этим pRi T-ДНК трансформированные корни сохраняют в условиях *in vitro* генетическую стабильность и способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения вторичных метаболитов, что отличает их от культуры не

дифференцированно растущих клеток и тканей. Однако следует отметить, что генетически трансформированные корни, также как и корни ювенильных растений, имеют первичную структуру. Этот анатомический признак отличает их от корней сформированных интактных растений, у которых вторичный рост и утолщение корней обусловлены проявлением камбиальной активности.

2. Жизнеспособность инкапсулированных корневых фрагментов, иммобилизованных в виде ИС. Самой высокой всхожестью ИС из всех трех исследуемых культур обладали «семена», полученные из корней *Rhodiola rosea*, инкапсулированные фрагменты которых больше года сохраняли свою жизнеспособность в иммобилизованном при температуре 4°C состоянии. Как видно из рис.2, количество жизнеспособных ИС этой культуры даже после четырех месяцев сохранения в этих условиях составляло 90-95% от общего числа заложенных на хранение семян.

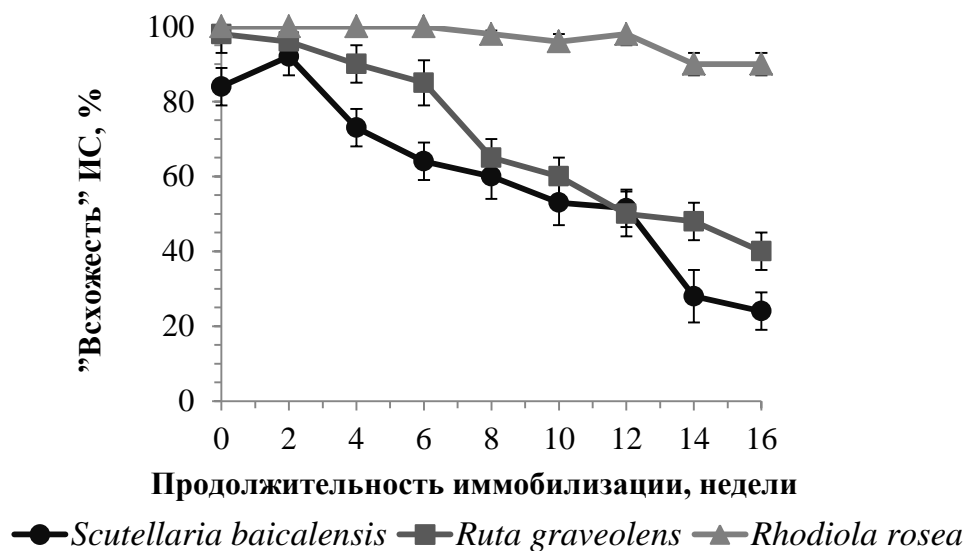


Рис. 2. Сравнительная оценка жизнеспособности корневых фрагментов отдельных культур по всхожести ИС в зависимости от продолжительности их иммобилизации при температуре 4°C.

Иммобилизация корневых фрагментов *Scutellaria baicalensis* и *Ruta graveolens* в виде ИС протекала с большими потерями. Так, было обнаружено, что процент жизнеспособных ИС *Scutellaria baicalensis* при их проращивании непосредственно после инкапсуляции корневых фрагментов составлял 75-80% от общего количества семян (рис.2). Однако максимальный подъем «всхожести» ИС (90-95%) наблюдался

после 2-недельного сохранения корневых фрагментов при температуре 4°C, что возможно было связано с адаптацией корневых фрагментов к стрессовому воздействию самого процесса инкапсуляции и низкой положительной температуры. После 4 месяцев хранения происходило резкое снижение жизнеспособности инкапсулированных корневых фрагментов *Scutellaria baicalensis* до 25-30%. Гибель фрагментов корней этой культуры наступала на пятый месяц их хранения при 4°C (рис.2).

На необходимость присутствия питательных веществ в гелевом матриксе ИС *Scutellaria baicalensis* указывала низкая «всхожесть» семян при инкапсулировании корневых фрагментов в гелевую оболочку, не содержащую питательных веществ: они гибли уже после 5-6-недельного хранения ИС при 4°C. Корневые фрагменты *Ruta graveolens* в гелевой оболочке без питательных веществ сохраняли жизнеспособность гораздо дольше, чем корни *Scutellaria baicalensis*, что возможно связано с генотипическими различиями корневых культур этих растений. Экспериментальный подбор компонентов гелевой оболочки ИС определил наиболее благоприятные условия сохранения жизнеспособности растительных тканей корневых фрагментов для каждой из культур. Корневые фрагменты *Scutellaria baicalensis* лучше сохранялись в гелевой оболочке, содержащей питательные вещества обычной для этих корней культуральной среды Гамборга (В-5), а *Ruta graveolens* – в оболочке со средой $\frac{1}{2}$ МС, которая не является для нее культуральной (рис.3).

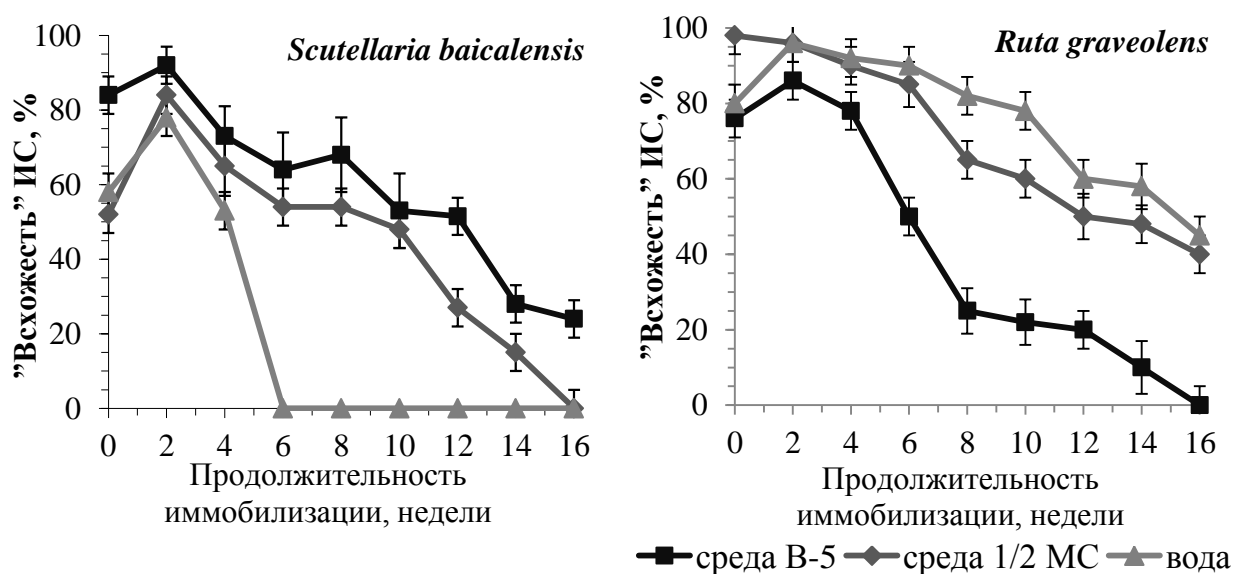


Рис. 3. Динамика прорастания корневых фрагментов из ИС в зависимости от продолжительности их хранения при температуре 4°C и от состава гелевой оболочки.

Несмотря на то, что для получения ИС были использованы молодые, апикальные участки корней, жизнеспособность ИС зависела также от возраста исходных корневых эксплантов, взятых для инкапсулирования. Так, было отмечено, что всхожесть ИС *Scutellaria baicalensis* после 4,5 месяцев хранения была выше у ИС, полученных из 2-недельных корневых культур. Она составляла 60% против 25% жизнеспособных инкапсулированных корневых фрагментов, полученных от 5-недельной культуры корней.

3. Основные ростовые и физиологические показатели исследуемых культур после применения метода инкапсулирования корневых фрагментов. Показатели физиологического состояния корневых культур (ростовая активность и оводненность корней, интенсивность потребления ими питательных веществ и изменение уровня рН среды), как правило, остаются стабильными от пассажа к пассажи, если не возникает каких-либо сбоев в контролируемых условиях культивирования – повышения или понижения температуры, отключения автоматической аэрации корней, нарушения стерильности культур и их инфицирования. Однако в течение одного пассажа эти характеристики могут изменяться в зависимости от продолжительности цикла культивирования, что определяется возрастом и жизнеспособностью апикальных меристем корневых культур, которые являются оптимальными для очередной пересадки корней. Так, было экспериментально установлено, что при 5-недельном выращивании масса корней *Scutellaria baicalensis* увеличивалась почти в 18 раз (РИ=17,5), а при пролонгированном культивировании (до 7 недель) – в 35 раз (РИ=34) (табл.1).

Таблица 1. Сравнительная оценка показателей ростовой активности возобновленных из ИС корневых культур *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea*.

Физиологические показатели	Культура корней	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Rhodiola rosea</i>
Сырой вес корней, г	исходный эксплант	1,1±0,1	1,3±0,2	0,9±0,1
	в конце пассажа	19,3±1,5	17,3±0,5	4,5±0,8
	пролонгированная*	37,1±1,5	17,6±0,5	6,1±0,1
Содержание сухого вещества, %	в конце пассажа	6,2±0,2	8,4±0,1	7,8±0,1
	пролонгированная*	5,1±0,2	5,5±0,3	10,1±0,1
Ростовой индекс (РИ)	в конце пассажа	17,5±1,4	13,3±0,5	5,0±0,8
	пролонгированная*	33,7±1,4	13,5±0,5	6,8±0,5

*Пролонгированная культура – длительное культивирование корней (до 7-8 недель) с обновлением питательной среды.

Цикл культивирования корней *Ruta graveolens* длился так же 5 недель, за которые корневая масса увеличивалась относительно исходного экспланта в 13 раз. Однако продолжительное (до 7 недель) культивирование корней *Ruta graveolens* не приводило к существенному увеличению их ростовой активности (табл.1). Пересадки корневой культуры *Rhodiola rosea* проводили через каждые 3 недели, при этом ростовая активность корней была, по сравнению с другими культурами, невысока (РИ=5), и при продолжительном культивировании ростовой индекс увеличивался до 7 (табл.1).

При оценке содержания сухого вещества в исследуемых образцах корневых культур трех растений *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea* наблюдались как видовые различия, так и различия в течение одного цикла культивирования корней каждого вида. Наибольшим содержанием сухого вещества в конце пассажа характеризовалась корневая культура *Ruta graveolens* (8,4%), а наименьшим – корневая культура *Scutellaria baicalensis* (6,2%) (табл.1). Кроме того, длительное культивирование корней *Scutellaria baicalensis* и *Ruta graveolens* сопровождалось снижением содержания в них сухого вещества, которое к концу 7-й недели культивирования этих культур составляло около 5,5%. Иная картина наблюдалась в цикле выращивания корневой культуры *Rhodiola rosea*, содержание сухого вещества в которой при 7-недельном культивировании заметно увеличивалось и достигало 10%.

Для определения степени потребления корневыми культурами *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea* минеральных элементов субстрата проводилось еженедельное измерение показателей электропроводности культуральных сред при выращивании исследуемых культур в течение пассажа. Контролем служили, питательные среды, электропроводность которых измеряли до помещения в них эксплантов корней. Данные измерения электропроводности питательных сред в конце цикла культивирования корней приведены в таблице 2. Кроме электропроводности, важной характеристикой питательных сред, отражающей физиологическое состояние корневых культур, является величина рН. В результате анализа показателей рН питательных сред в процессе выращивания исследуемых корневых культур было отмечено, что характерной особенностью интенсивно растущих корневых культур *Scutellaria baicalensis* и *Ruta graveolens* было незначительное подщелачивание питательных сред к концу пассажа с 5,6 до 6,5 и 5,8 соответственно (табл.3). В то же

время, при культивировании корней *Rhodiola rosea* значение рН питательной среды к концу пассажа практически не изменялось, однако при их длительном выращивании происходило подкисление питательной среды до 5,2 (табл.3).

Таблица 2. Сравнительная оценка электропроводности питательных сред при выращивании возобновленных из ИС корневых культур *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea*.

Культура корней	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Rhodiola rosea</i>
в начале пассажа	3,73±0,01	3,73±0,01	1,27±0,05
в конце пассажа	1,40±0,03	1,73±0,03	0,85±0,06
продолгованная*	0,98±0,02	1,21±0,01	1,01±0,02

*Продолгованная культура – длительное культивирование корней (до 7-8 недель) с обновлением питательной среды.

Таблица 3. Сравнительная оценка показателей рН питательных сред при выращивании возобновленных из ИС корневых культур *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea*.

Культура корней	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Rhodiola rosea</i>
в начале пассажа	5,6±0,01	5,6±0,01	5,8±0,33
в конце пассажа	6,5±0,02	5,8±0,03	5,8±0,02
продолгованная*	6,2±0,02	5,8±0,08	5,2±0,02

*Продолгованная культура – длительное культивирование корней (до 7-8 недель) с обновлением питательной среды.

Необходимо отметить, что культуры изолированно растущих корней не только поглощали макро- и микроэлементы из питательных сред, но и выделяли в них некоторое количество продуктов вторичного метаболизма (фенольные соединения, алкалоиды), образующихся в них, что было заметно по окраске питательных сред.

После проведения оценки основных физиологических параметров корневых культур *Scutellaria baicalensis*, *Ruta graveolens* и *Rhodiola rosea* было установлено, что низкотемпературная иммобилизация корневых фрагментов в виде ИС практически не влияет на ростовые показатели и на метаболическую активность возобновленных из них корневых культур при обычных условиях культивирования. Однако дальнейшее исследование линий корневых культур показало, что возможно проявление морфологических и физиологических изменений корней *Ruta graveolens* и *Scutellaria baicalensis*, полученных из ИС в условиях освещения.

4. Морфологические и физиологические особенности корневой культуры *Ruta graveolens*, полученной из ИС в условиях освещения. В процессе «проращивания» ИС, полученных из культуры корней *Ruta graveolens*, на агаризованной питательной среде в условиях освещения на 3-4 неделе после прорастания корневых фрагментов через альгинатную оболочку происходило формирование зачатков зеленых побегов (рис.4). Наиболее склонными к регенерации целых растений оказались корневые фрагменты, полученные из молодых 2-недельных корневых культур, которые в виде ИС были выдержаны в условиях низкой положительной температуры в течение двух-шести недель. Следует отметить, что при проращивании инкапсулированных корневых фрагментов без их выдерживания при температуре 4°C, побегообразования не происходило. У исходной корневой культуры *Ruta graveolens*, не подвергавшейся иммобилизации с помощью ИС, при выращивании в жидкой питательной среде в темноте (так называемая «погруженная темновая культура») иногда наблюдалось на 6-7-й неделе культивирования формирование единичных этиолированных побегов, которые после помещения на свет также формировали розетки зеленых микропобегов. Однако при поверхностном культивировании корней *Ruta graveolens* на агаризованной питательной среде в чашках Петри побегообразования не происходило ни в условиях освещения, ни в темноте. Количество потенциальных хорошо дифференцированных стеблевых регенерантов *Ruta graveolens*, формировавшихся при проращивании инкапсулированных корневых фрагментов, составляло около 10% от исходного количества подготовленных ИС, и из них в дальнейшем были получены полноценные растения.

5. Морфологические и физиолого-биохимические особенности корневой культуры *Scutellaria baicalensis*, полученной из ИС в условиях освещения. Морфологические изменения, связанные с действием света на корневые фрагменты после их длительной иммобилизации при температуре 4°C, наблюдались также и у корневой культуры *Scutellaria baicalensis*. После помещения на свет чашек Петри с прораставшими из ИС корневыми фрагментами корни начинали интенсивно зеленеть, сохраняя это свойство при последующих пересадках в течение трех лет (рис.5). Накопление зеленого пигмента происходило, в основном, в базальных частях корней, которые при этом заметно утолщались, кончики же их оставались белыми.

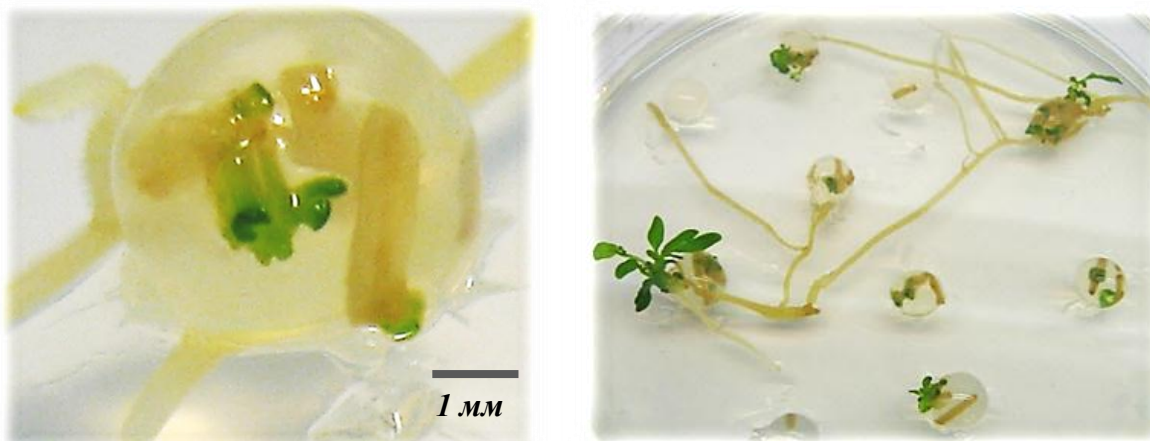


Рис. 4. Формирование зачатков микропобегов при проращивании ИС, полученных из корневой культуры *Ruta graveolens*.

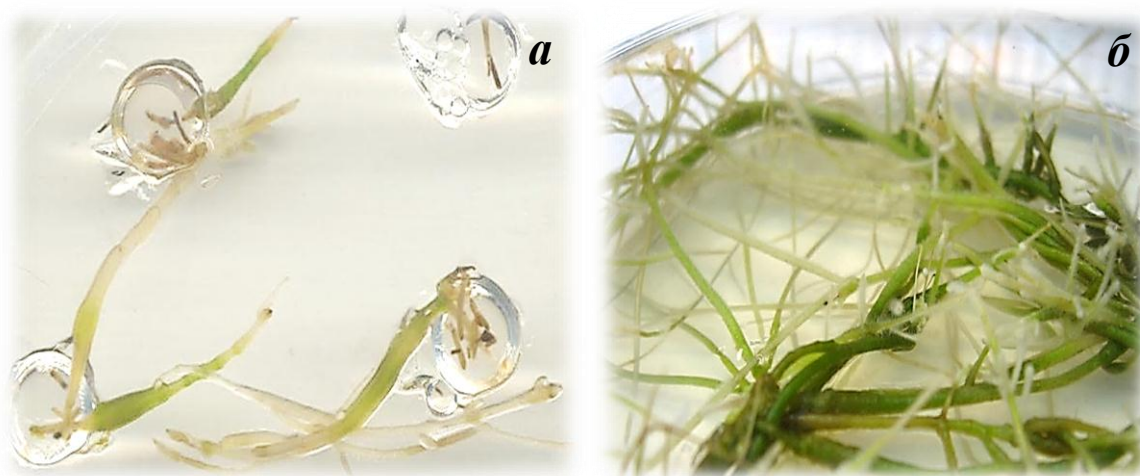


Рис. 5. Морфологические изменения в корневой культуре *Scutellaria baicalensis*, растущей в условиях освещения, после длительной иммобилизации корневых фрагментов:

- а* – прорастание зеленеющих корней через альгинатную оболочку ИС;
- б* – культура изолированно растущих зеленых корней на агаризованной среде.

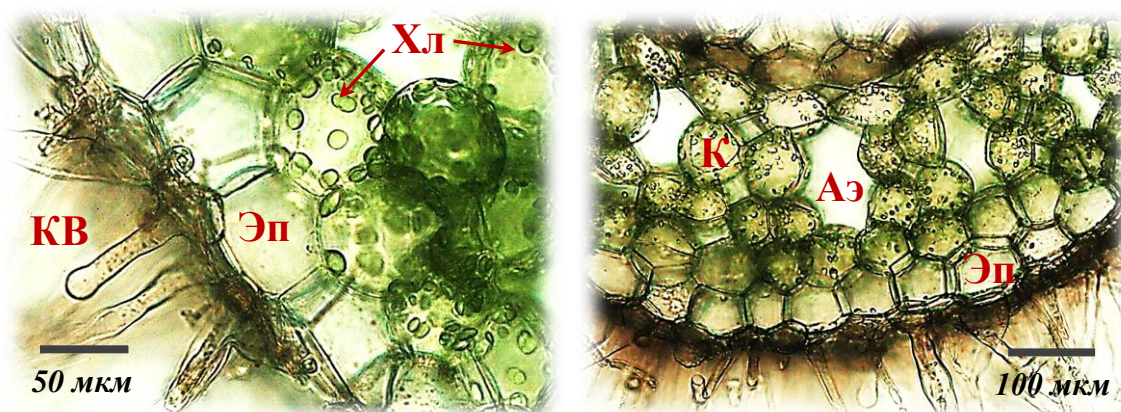


Рис. 6. Расположение хлоропластов (Хл) в клетках зеленых корней *Sc.baicalensis* (К – первичная кора корня; Эп – эпидерма; Аэ – аэренхима; КВ – корневые волоски).

Следует отметить, что исходная длительно культивируемая корневая культура *Scutellaria baicalensis*, не подвергавшаяся иммобилизации с помощью метода ИС, не проявляла изменения окраски корней даже после 14 дней культивирования в условиях освещения.

В литературе описаны случаи формирования хлоропластов на свету в изолированно растущих корнях – как в корнях, отделенных от проростков (Burstrom, 1960, 1961; Смирнов, 1970), так и в корневых культурах, полученных в результате трансформации Ri-плазмидой (Flores et al., 1993; Tone et al., 1997; Bhadra et al., 1998; Kino-oka et al., 2001; Jacob & Malpathak, 2004). Однако практически во всех работах речь шла о культурах с небольшим сроком пассирования в условиях *in vitro*. Корневая культура *Scutellaria baicalensis* почти 18 лет неизменно выращивалась в условиях темноты и не проявляла изменения окраски корней при помещении ее на свет. Однако после проведения корневых фрагментов этой культуры через низкотемпературную иммобилизацию с помощью метода ИС в клетках корней в условиях освещения наблюдалось образование хлоропластов, появление которых могло быть связано с изменениями, вызванными действием низких положительных температур.

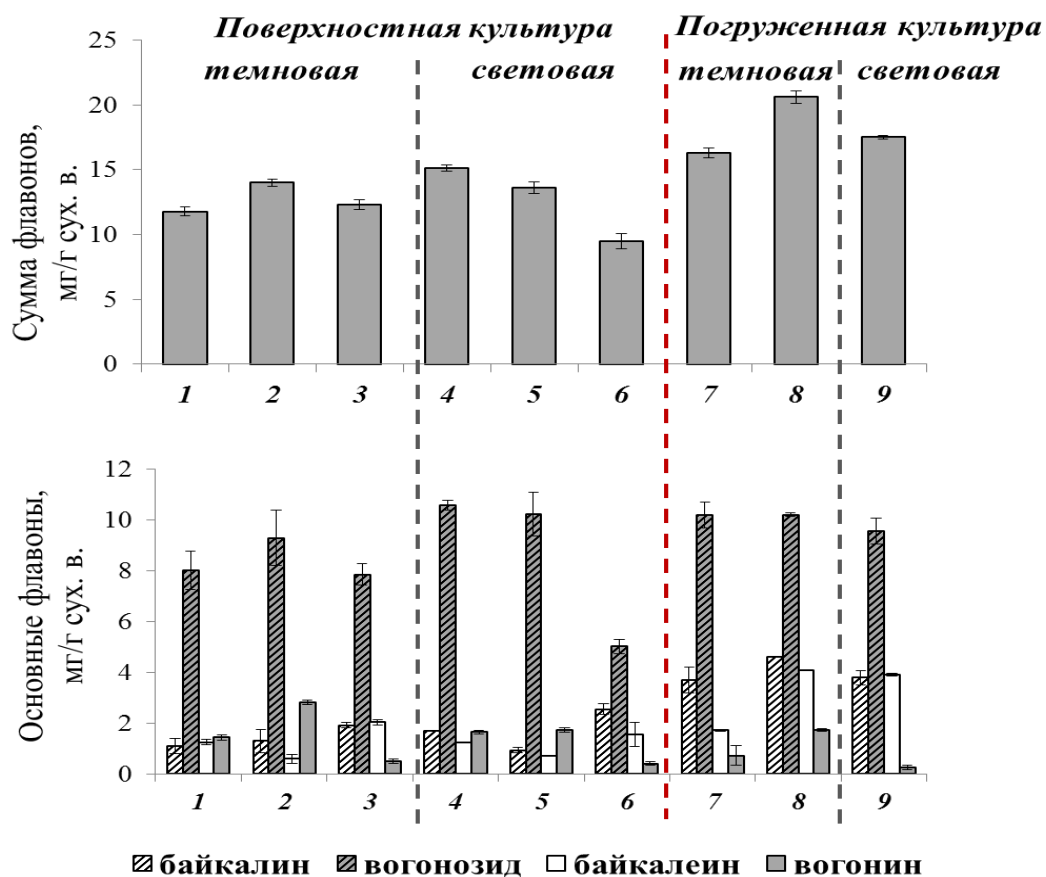
Таким образом, в результате низкотемпературной иммобилизации корневых фрагментов нами была получена линия изолированно растущих корней *Scutellaria baicalensis*, в клетках которых в условиях освещения наблюдалось формирование хлоропластов (рис.6). При исследовании поперечных тонких срезов зеленых участков корней с помощью световой микроскопии было обнаружено, что хлоропласты заполняли клетки всех слоев первичной коровой паренхимы корня, кроме внешнего слоя – эпидермы, и практически отсутствовали в клетках центрального цилиндра. Суммарное содержание хлорофилла *a* и *b* в зеленых корнях было почти в 3 раза ниже, чем в листьях целого растения, но в 1,5 раза выше, чем в его стеблях. При этом в зеленых корнях преобладал хлорофилл *b*, по сравнению с соотношением хлорофиллов *a* и *b* в надземной части растения *Scutellaria baicalensis*, что может быть следствием различий структурно-функциональной организации фотосинтетических аппаратов у исследуемых объектов. Сравнительный анализ кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* (*OJIP*) в зеленых корнях *Scutellaria baicalensis* и в фотосинтезирующих листьях интактного растения, показал, что кинетика нарастания участков *O-J-I-P* кривых и относительная амплитуда пиков в исследуемых объектах практически

идентичны. Определение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (*NPQ*) под действием насыщающих световых вспышек продемонстрировало адаптационную способность фотосинтетического аппарата хлоропластов зеленых корней *Scutellaria baicalensis* к условиям сильного света, что является характерной чертой для фотосинтезирующих листьев. Таким образом, можно заключить, что в хлоропластах корней *Scutellaria baicalensis*, культивируемых в условиях освещения, функционирует правильно сформированный комплекс фотосистемы II.

Для выявления участия света в биосинтезе основных действующих веществ корней *Scutellaria baicalensis* – флавонов байкалеина, вогонина и соответствующих им глюкуронидов байкалина и вогонозида – был проведен хроматографический анализ состава вторичных соединений в линиях корневой культуры *Scutellaria baicalensis*, полученных из ИС и выращенных в темноте («темновая культура») и на свету («световая культура»). При планировании эксперимента учитывалась длительность цикла культивирования исходных культур, экспланты которых использовали при пересадке, продолжительность пассажа и способ выращивания корней – в условиях погруженной и поверхностной культуры (то есть в жидкой и на агаризованной питательных средах соответственно). В ходе анализа метанольных экстрактов разных вариантов корневых культур *Scutellaria baicalensis* с помощью ВЭЖХ было установлено, что наиболее продуктивными по синтезу основных флавонов были корни, выращенные в погруженной культуре в темноте (рис.7, вариант 8).

Накопление вторичных метаболитов увеличивалось с возрастом культивируемых корней в течение одного пассажа. Так, 6-недельная культура *Scutellaria baicalensis* содержала в 1,5 раза больше флавонов в пересчете на единицу сухого веса корней, чем 3-недельная, при этом количественное соотношение байкалина, вогонозида и их агликонов оставалось практически одинаковым (рис.7, варианты 7, 8). В условиях освещения в погруженной культуре корней *Scutellaria baicalensis* общая концентрация флавонов снижалась, по сравнению с темновой культурой, и изменялось количественное соотношение агликонов и глюкуронидов в корнях (рис.7, вар. 8, 9).

При поверхностном культивировании корневой культуры *Scutellaria baicalensis* на агаризованной питательной среде (рис.7, варианты 1-6) как в условиях освещения, так и в темноте наблюдалось снижение в корнях концентрации флавонов в 1,2-1,5 раза, по сравнению с погруженной корневой культурой (рис.7, варианты 7-8).



Поверхностная культура

- 1 – 3-нед. в темноте – из 2-нед. экспланта
- 2 – 3-нед. в темноте – из 6-нед. экспланта
- 3 – 5-нед. в темноте – из 6-нед. экспланта
- 4 – 3-нед. на свету – из 2-нед. экспланта
- 5 – 3-нед. на свету – из 6-нед. экспланта
- 6 – 5-нед. на свету – из 6-нед. экспланта

Погруженная культура

- 7 – 3-нед. в темноте
- 8 – 6-нед. в темноте
- 9 – 6-нед. на свету

Рис. 7. Качественный и количественный состав основных флавонов в корнях *Scutellaria baicalensis* в зависимости от условий их культивирования

Различалось и соотношение основных флавонов в корневых культурах – так, в корнях, выращенных на твердой питательной среде, концентрация агликона вогонина была в 1,5 раза выше, чем в корнях погруженной культуры *Scutellaria baicalensis*. При этом содержание его глюкуронида вогонизида оставалось в этих культурах неизменным, а количество байкалина и байкалеина заметно снижалось в поверхностных культурах корней, выращенных как в условиях освещения, так и в темноте. Следует отметить также, что возраст исходных корневых культур *Scutellaria baicalensis*, из которых отбирали экспланты для пересадки корней на агаризованную питательную среду, не

оказывал существенного влияния на общее содержание основных флавонов и на их соотношение в корневых культурах в конце пассажа (рис.7, варианты 1-6).

Сравнительный хроматографический анализ метанольных экстрактов корневых культур *Scutellaria baicalensis*, выращенных в темноте и в условиях освещения, а также экстрактов стеблей и листьев целого растения показал, что в изолированно растущих корнях, выращенных в темноте, количественное содержание фенольных соединений было наибольшим. Таким образом, полученные данные доказали стабильность корнеспецифического образования флавонов *Scutellaria baicalensis* и независимость их биосинтеза от присутствия в клетках хлоропластов.

6. Тестирование корневых культур на наличие инфекции и устранение контаминации в изолированно растущих корнях *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea*. Изменение физиолого-биохимических параметров культивируемых *in vitro* генетически трансформированных корней иногда может провоцироваться их неконтролируемым инфицированием. Проводимое тестирование питательных сред на контаминацию (заражение) выявляло в корневых культурах *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea* наличие бактериальной инфекции. Для установления источника контаминации были взяты не только пробы культуральных питательных сред, но и 96%-го спирта, используемого для стерилизации инструментов перед их прожиганием в пламени спиртовки в процессе пересадок культур. Все пробы на контаминацию дали положительный результат. В пробах 96%-ного спирта также были выявлены колонии бактерий, которые и становились причиной перекрестного заражения здоровых корневых культур *in vitro* при повторном использовании простерилизованных с помощью такого спирта инструментов.

Микроскопический анализ бактериальных колоний позволил выяснить предположительную причину неизвестной контаминации. Возбудителем инфекции в стерильной культуре являлась грамположительная спорообразующая бактерия рода *Bacillus*. К настоящему времени известно много фактов микробной контаминации антисептиков, используемых в медицинской практике (Rutala & Cole, 1984; Красильников, 1995), в том числе и этилового спирта (Hsueh et al., 1999; Гольдинберг и др., 2005). Авторами было описано заражение 95%-го этилового спирта почвенной грамположительной спороносной бактерией *Bacillus polymyxa* (в современной номенклатуре – *Paenibacillus polymyxa* (Ash et al., 1993; Truper, 2005)).

Для удаления проявляющейся бактериальной инфекции в практике культивирования изолированно растущих корней в условиях *in vitro* обычно проводят добавление антибиотика в питательную среду, что не всегда бывает эффективным и лишь на время снижает интенсивность нежелательной контаминации. В связи с этим нами был разработан способ локального элиминирования (удаления) бактериальной инфекции из корневых культур, основные этапы которого представлены на рисунке 8.

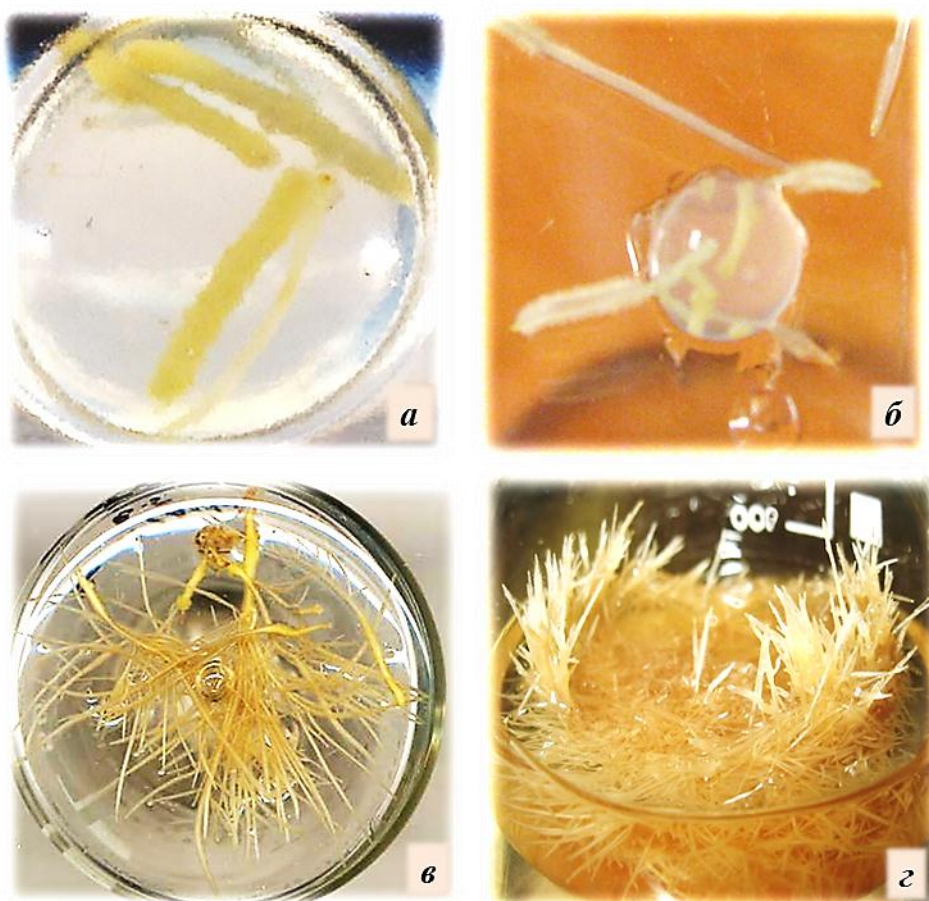


Рис. 8. Основные этапы удаления инфекции из корневой культуры в условиях *in vitro* (на примере *Scutellaria baicalensis*):

а - инкапсулирование корневых фрагментов в гелевую оболочку, содержащую антибиотик клафоран (300-600 мг/л) и выдерживание полученных ИС при температуре 4°C в течение 2-6 недель;

б - проращивание ИС в обычных условиях культивирования и отделение прорастающих через альгинатную оболочку кончиков корней;

в - культивирование корневых кончиков в питательных средах без внесения антибиотика;

г - получение массы оздоровленных корней.

Экспериментально подобранная концентрация 450 мг/л клафорана в гелевом матриксе ИС была наиболее оптимальной. При этом количестве антибиотика даже

после 2-недельной иммобилизации инфицированных корневых фрагментов в случае *Scutellaria baicalensis*, и 4-недельной – в случае *Rhodiola rosea*, ИС давали начало оздоровленным линиям корневых культур, сохранявшим стерильность в течение последующих пассажей. Можно предположить, что положительный эффект от сохранения ИС, содержащих в своей оболочке антибиотик, при пониженной температуре в течение 2-4 недель, был обусловлен длительным локальным и поэтому более *эффективным* бактерицидным действием клафорана, в результате которого происходило полное удаление инфекции из корневых фрагментов и их оздоровление.

В результате применения разработанного на основе метода ИС нового способа оздоровления длительно растущих и подверженных инфицированию культур корней *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea* контаминация в них не проявлялась в течение последующих 1,5 лет (15 пассажей для *Scutellaria baicalensis* и 25 пассажей для *Rhodiola rosea*), а жизнеспособность корней заметно возросла. Так, на примере корневой культуры *Scutellaria baicalensis*, в таблице 4 представлены результаты сравнительной оценки ростовой и биосинтетической активности корней до и после применения метода иммобилизации корневых фрагментов с помощью ИС.

Таблица 4. Сравнительная оценка основных физиологических показателей культуры корней *Scutellaria baicalensis* до и после обновления с помощью метода ИС.

Основные показатели	Исходная неинфицированная корневая культура (2007 год)	Инфицированная корневая культура до обновления (2009 год)	Корневая культура, полученная из ИС (2010 год)
Сырой вес корней, г	18,5±1,3	11,4±1,3	19,3±1,5
Содержание сухого вещества, %	6,3±0,2	9,9±0,2	6,4±0,2
Содержание основных флавонов, мг/г сух.веса	22,4±0,2	8,2±0,1	21,4±0,4
Продуктивность 6-недельной культуры, мг/колба	26,1±0,3	9,3±0,2	26,4±0,4

Масса обновленной культуры корней *Scutellaria baicalensis*, выращенной в одной колбе в течение пассажа, почти в 2 раза превысила массу корней, которая была ранее ослаблена проявлявшейся инфекцией, и стала сопоставимой с показателями исходной, неинфицированной культуры (табл.4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование природного феномена генетической трансформации растительного материала почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes* в биотехнологических целях привело к получению изолированно растущих в условиях *in vitro* культур корней растений, представляющих интерес для человека. Такие корневые культуры, стабильно растущие на безгормональных питательных средах, уже многие годы служат объектами исследования физиологических и биохимических процессов, протекающих в корневой системе растений, а также успешно используются при изучении симбиотических взаимоотношений корней с представителями ризосферы.

Способность генетически трансформированных корней к сохранению биосинтеза корнеспецифичных вторичных метаболитов в условиях *in vitro* стала предпосылкой для их возможного использования в качестве альтернативного экологически чистого лекарственного сырья в медицинской и пищевой промышленности, и в связи с этим для их крупномасштабного выращивания в биореакторах, что уже реализовано в ряде лабораторий зарубежных стран. Однако переход к крупномасштабному культивированию больших масс корней лекарственных растений диктует необходимость тщательной отработки отдельных этапов его использования, в число которых входят такие факторы как надежность сохранения стерильности растительного материала – маточных инокулятов корней – и безопасность их успешной транспортировки на ближние и дальние расстояния.

В данной работе проведена экспериментальная апробация метода получения «искусственных семян», заключающегося в инкапсулировании корневых фрагментов в гелевую оболочку, в качестве нового способа совершенствования техники культивирования изолированно растущих рRi T-ДНК трансформированных корней *in vitro*. Понятие «искусственные семена» применительно к работе с культурой трансформированных корней как с потенциальным источником лекарственного сырья имеет несколько иное значение, чем в работах исследователей, целью которых было микроклональное размножение растений с применением метода ИС (Murashige, 1978; Khor & Loh, 2005). В данном случае речь идет о сохранении корневых культур лекарственных растений в виде ИС для последующего возобновления из них массы корней, представляющих собой особую живую систему, изолированно растущую в условиях *in vitro*.

ВЫВОДЫ

1. На примере корневых культур трех видов растений – *Ruta graveolens*, *Scutellaria baicalensis* и *Rhodiola rosea* – показано, что инкапсулированные в гелевую оболочку фрагменты корней сохраняют свою жизнеспособность в иммобилизованном при температуре 4°C состоянии в течение длительного времени (от 6 до 12 месяцев) и при обычных условиях культивирования дают начало обновленным, хорошо растущим линиям корневых культур.
2. Длительность хранения корневых фрагментов в иммобилизованном состоянии в виде ИС определяется, прежде всего, их жизнеспособностью после переноса в обычные условия культивирования, а также зависит от состава питательных веществ в гелевой матрице ИС, возраста исходных корневых эксплантов, взятых для инкапсулирования, и от морфологических и физиологических особенностей исходных корневых культур.
3. Низкотемпературная иммобилизация корневых фрагментов в виде ИС не вызывает существенного изменения основных ростовых и физиолого-биохимических параметров возобновленных из них корневых культур.
4. Культивирование возобновленных из ИС линий корневых культур *Ruta graveolens* и *Scutellaria baicalensis* в условиях освещения приводит к проявлению стеблевого органогенеза в первом случае и к интенсивному образованию хлоропластов в клетках корней – во втором, что может быть обусловлено фенотипическими особенностями реакции этих растений на стрессовые факторы.
5. Впервые доказано, что иммобилизация фрагментов инфицированных корней в виде ИС, гелевый матрикс которых содержит антибиотик, является новым эффективным способом элиминирования бактериальной инфекции.
6. Длительное сохранение жизнеспособности корневых фрагментов в виде ИС, позволяет использовать их в качестве резервного фонда, для транспортировки культур на дальние расстояния, а также при подготовке маточных инокулятов в случае перехода к крупномасштабному культивированию корней ценных лекарственных растений в биореакторах.

СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2006) «Искусственные семена» – способ сохранения жизнеспособности растительных тканей. (IX) Международная Конференция молодых ботаников, Санкт-Петербург, с. 138 (тезисы).
2. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н., Паец Х., Шнайдер Б.** (2007) Культивируемые *in vitro* корни копеечника чайного и образование в них фенольных соединений. *Физиология растений*. Т. 54, № 4, с. 604-613.
3. **Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Вдовитченко М.Ю.** (2007) Генетически трансформированные корни растений как потенциальный источник экологически чистого лекарственного сырья. 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности», Москва, с. 55 (тезисы).
4. **Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Альтерман И.Е., Гусева А.В., Суслов Н.И.** (2008) Биотехнологический способ получения экологически чистого лекарственного сырья исчезающего ценного растения. Симпозиум «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств», Москва, с.102 (тезисы).
5. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2008) «Искусственные семена» как способ сохранения жизнеспособности растительных тканей. IX Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология», Звенигород, с.64-65 (тезисы).
6. **Kuzovkina I.N., Vdovitchenko M.J., Suslov N.I., Churin A.A., Gusseva A.V.** (2009) Biotechnological production of ecologically pure raw material of valuable medicinal plant. German-Russian Forum Biotechnology, Novosibirsk, p. 30 (тезисы).
7. **Вдовитченко М.Ю.** «Искусственные семена» как способ получения экологически чистого лекарственного сырья и сохранения исчезающих видов растений. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010», Москва, с. 249 (тезисы).
8. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2011) «Искусственные семена» как способ сохранения и оздоровления культивируемых *in vitro* корней лекарственных растений. *Физиология растений*. Т. 58, №3. с. 461-468.

9. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2011) «Искусственные семена» как способ получения экологически чистого лекарственного сырья и сохранения исчезающих видов растений. *Вестник Московского университета. Сер.16, Биология.* N2. С.4-6.
10. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2011) «Искусственные семена» как способ сохранения и оздоровления культур рRi T-ДНК трансформированных корней лекарственных растений. VII Съезд общества физиологов растений России. Международная конференция «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий», Нижний Новгород, с. 130 (тезисы).
11. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2011) Сохранение и оздоровление культивируемых *in vitro* корней лекарственных растений с помощью искусственных семян. Международная научно-практическая конференция «Инновационные биотехнологии в странах ЕврАзЭС», стр. 120-132. Минск, Белоруссия (тезисы).
12. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** (2011) Способ получения «искусственных семян» из культуры корня шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Патент РФ № 2415928.
13. **Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю.** (2011) Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения. *Физиология растений.* Т.58, № 5, с. 787-797.
14. **Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю.** (2012) Генетически трансформированные корни как модельная система для изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. С. 37-53.
15. **Прокофьева (Вдовитченко) М.Ю.** (2012) Влияние света на биосинтез фенольных соединений в культивируемых *in vitro* корнях шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi). VIII Международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, с. 422 (тезисы).