

Е. Б. Глоба¹, Е. В. Демидова¹, В. В. Гайсинский¹, Д. В. Кочкин²

Получение и характеристика каллусной и суспензионной культур клеток тиса Валлиха (*Taxus wallichiana* Zucc.)

¹ФБГУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН), Москва, Россия

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. Представители рода *Taxus* spp. являются продуцентами ценных противоопухолевых соединений дитерпеноидного ряда (таксоидов). Медленный рост, ограниченные природные ресурсы, исчезающее малое содержание таксоидов в интактных растениях заставляют искать альтернативные источники получения растительного сырья для фармацевтической промышленности. Одним из перспективных вариантов решения данной проблемы является использование культур клеток и тканей высших растений, которое позволяет получать сырье вне зависимости от времени года, погодных условий и без ущерба для окружающей среды. К настоящему времени известно более 10 видов тиса, для ряда из них получены и охарактеризованы каллусные и суспензионные культуры клеток. В наших предыдущих исследованиях были получены и охарактеризованы культуры клеток четырех видов тиса: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. × media*. В настоящей работе представлены результаты по введению в культуру *in vitro* тиса Валлиха *Taxus wallichiana* Zucc. – эндемика горных районов южной Азии (Гималаи). Для получения каллусной и суспензионной культур клеток использовали ранее отработанный на других видах *Taxus* spp. алгоритм работ – выбор и подготовку эксплантов, состава сред для каллусогенеза и обоснование необходимости их модификации при переходе к последующему субкультивированию. В результате получены каллусные и суспензионные культуры клеток

ГЛОБА Елена Борисовна – н. с. отдела биологии клетки и биотехнологии ФБГУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН).

E-mail: el_globa@mail.ru

GLOBA Elena Borisovna – Researcher at the Cell Biology and Biotechnology Department Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences.

ДЕМИДОВА Елена Викторовна – к. б. н., н. с. отдела биологии клетки и биотехнологии ФБГУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН).

E-mail: donzdonz@qip.ru

DEMIDOVA Elena Viktorovna – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Cell Biology and Biotechnology Department Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences.

ГАЙСНСКИЙ Валентин Владимирович – н. с. отдела биологии клетки и биотехнологии ФБГУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН).

E-mail: izgnannik-b@yandex.ru

GAISINSKY Valentin Vladimirovich – Researcher at the Cell Biology and Biotechnology Department Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences.

КОЧКИН Дмитрий Владимирович – к. б. н., с. н. с. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

E-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

KOCHKIN Dmitry Vladimirovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Department of Plant Physiology Faculty of Biology M.V. Lomonosov Moscow State University.

тиса Валлиха, которые поддерживаются в коллекции отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН в течение трех лет и характеризуются высоким уровнем жизнеспособности (для суспензионной культуры клеток не ниже 90 % на протяжении всего цикла выращивания) и стабильными ростовыми характеристиками. Индекс роста каллусной культуры клеток находится в пределах 4-5, суспензионной – 8-9, что является высоким показателем для традиционно медленно растущих культур клеток *Taxus spp.* Проведен анализ таксоидов в полученных каллусных и суспензионных культурах клеток *Taxus wallichiana*. По данным ВЭЖХ-МС анализа, в биомассе суспензионной культуры клеток *T. wallichiana* найдены дитерпеноиды таксанового ряда, которые относятся к структурному типу тайванксана (14-гидроксированные таксоиды): синенксан В, синенксан С, таксуюннин С, 2,5,9,10,14-пента-ацетокси таксадиен, юннанксан и изомер 7-гидрокси-2,5,10,14-тетра-ацетокси таксадиена, при этом преобладающим соединением является юннанксан. Таким образом, установлено, что в клетках суспензионной культуры клеток *T. wallichiana* преобладающими являются таксоиды, гидроксированные по С14 положению таксадиенового скелета. Для полученных в наших предыдущих исследованиях культур клеток других видов тиса было также отмечено образование С14-ОН таксоидов, что позволяет предположить, что образование соединений этого типа является характерной чертой метаболизма дитерпеноидов в клетках *in vitro*.

Ключевые слова: каллусные культуры клеток, суспензионные культуры клеток, ростовые характеристики культуры клеток, биосинтетические характеристики культуры клеток, тис (*Taxus spp.*), *Taxus Wallichiana*, биологически-активные вещества (БАВ), противоопухолевые соединения, дитерпеноиды, таксоиды, паклитаксел (таксол).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 16-14-00126.

DOI 10.25587/SVFU.2018.64.12127

Е. Б. Глоба¹, Е. В. Демидова¹, В. В. Гайсинский¹, Д. В. Кочкин²

Obtaining and Characteristics of Callus and Suspension Plant Cell Culture of *Taxus wallichiana* Zucc.

¹Department Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Plants of the genus yew (*Taxus spp.*) are the source of valuable antitumor compounds of the diterpenoid series (taxoids). Slow growth, limited natural resources, disappearing small taxoids content in intact plants make it necessary to look for alternative sources of plant material for the pharmaceutical industry. One of the promising options for solving this problem is the use of plant cell cultures and tissues, which allow producing raw materials regardless of the season, weather conditions and without damage to the environment. To date, more than 10 species of yew are known, for a number of them, callus and suspension cell cultures have been obtained and characterized. In our previous studies, plant cell cultures of four species of yew - *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. × media* - were initiated and characterized. This article presents results of the obtainment of the *Taxus Wallichiana* Zucc. endemic plant from the mountainous areas of southern Asia (Himalayas) *in vitro*. The algorithm of works previously used on other types of *Taxus spp.* - the selection and preparation of explants, the composition of mediums for callusogenesis and the need for their modification in the course of transition to subsequent sub-cultivation, was used for preparation of callus and suspension plant cell cultures. As a result, callus and suspension plant cell cultures of *Taxus wallichiana* were obtained. These cultures are maintained in Plant Cell Collections of the Cell Biology and Biotechnology Department of the IFR RAS over the course of three years and are characterized by a high level of viability (for the suspension culture more then 90 % during the full growing cycle) and stable growth characteristics. The growth index of callus culture is in the range of 4 to 5, for suspension culture is 8 to 9. This is a high index for traditionally

slow-growing plant cell cultures of *Taxus spp.* The taxoid composition in the obtained callus and suspension plant cell cultures of *Taxus wallichiana* was investigated. According to HPLC-MS analysis, taxane diterpenoids were found in the biomass of the plant suspension culture of *T. Wallichiana*, which belong to the structural type of taiwanxan (14-hydroxylated taxoids): sinenxan B, sinenxan C, taxuyunnanin C, 2,5,9,10,14-penta-acetoxy-taxadiene, yunnanxane and isomer of 7-hydroxy-2,5,10,14-tetra-acetoxy-taxadiene. The major compound was yunnanxane. Thus, it was established that in the plant suspension culture of *T. wallichiana*, taxoids hydroxylated at C14 of the taxadiene skeleton are predominant. For the plant cell cultures of other yew species obtained in our previous studies, the formation of C14-OH taxoids was also noted, suggesting that the formation of this type compounds is a characteristic feature of the metabolism of diterpenoids in plant cells *in vitro*.

Keywords: callus plant cell cultures, suspension plant cell cultures, growth characteristics of plant cell culture, biosynthetic characteristics of plant cell culture, genus yew (*Taxus spp.*), *Taxus Wallichiana*, biologically active substances, antineoplastic compounds, diterpenoids, taxoids, paclitaxel (Taxol).

The project was conducted with financial support from Russian Science Foundation (grant # 16-14-00126).

Введение

Одной из приоритетных задач в наше время является поиск новых эффективных противоопухолевых препаратов. Природный diterпеноид паклитаксел (Таксол®), источником которого служат представители рода *Taxus spp.*, является на сегодняшний день одним из самых известных противораковых соединений. Впервые паклитаксел был выделен из тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia* Nutt.) в 1966 году [1], годом позднее были получены первые медицинские данные об эффективности его применения в терапии некоторых видов рака [2]. Дальнейшие исследования показали наличие паклитаксела в других видах тиса, в том числе и в тисе Валлиха (другое название – тис гималайский). Содержание паклитаксела в интактном растении составляет примерно 0,05 % от сухой массы, и наибольшее его количество содержится в коре [3]. Помимо паклитаксела и других C-13-гидроксированных таксоидов (тип C13-ОН таксоидов) в тисе содержится ряд других полезных соединений. К ним, в частности, относятся C-14-гидроксированные таксоиды (например, таксуюннанин С, юннанксан и др.) [4-6].

Тис Валлиха *Taxus wallichiana* Zuss. – представитель немногочисленного рода *Taxus spp.*, многолетнее медленнорастущее хвойное растение, эндемик горных районов юго-восточной Азии (Гималаи), произрастает на высоте до 3700 м. Использование природных запасов сырья этого растения для промышленного получения таксола является крайне неэффективным, поскольку наносит непоправимый ущерб реликтовым лесам, кроме того, находится в прямой зависимости от погодных условий и времени года. Плантационное возделывание тиса из-за его медленного роста также не является решением проблемы получения сырья, полный химический синтез паклитаксела экономически не выгоден. Ввиду вышеизложенного использование культуры клеток растений в качестве круглогодичного, экологически чистого сырья имеет большую перспективу.

Впервые культура клеток тиса *T. brevifolia* была получена в 1974 году [7], до настоящего времени проведено множество работ по введению *in vitro* других видов тиса, по оптимизации условий выращивания этой непростой культуры [8]. Выращивание культур клеток всех видов тиса представляет собой известные трудности, связанные с медленным ростом, накоплением в клетках *in vitro* значительных количеств фенольных

соединений и специфических для рода *Taxus* дитерпеноидов, многие из которых, по всей видимости, негативно влияют на пролиферативную активность растительных клеток.

Несмотря на это, культура клеток и тканей высших растений может служить эффективным инструментом, способным решить многие задачи как фундаментальных, так и прикладных исследований – прежде всего образования ценных вторичных метаболитов, к числу которых относятся и дитерпеноиды *Taxus spp.* Используя различные методы и подходы, такие как оптимизация состава питательных сред, применение элиситоров и предшественников синтеза таксоидов, стрессовые воздействия, можно добиться стабильного увеличения их количества в культурах клеток тиса, в том числе тиса Валлиха, с перспективой дальнейшего масштабирования процесса выращивания культуры клеток и использования получаемой биомассы в качестве сырья для получения противоопухолевых препаратов.

В наших предыдущих исследованиях были получены и охарактеризованы культуры клеток четырех видов тиса: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. × media* [9]. Целью настоящей работы было введение в культуру *in vitro* тиса Валлиха *Taxus wallichiana* Zucc. Для получения каллусной и суспензионной культур клеток использовали ранее отработанный на других видах *Taxus spp.* алгоритм работ – выбор и подготовку эксплантов, состава сред для каллусогенеза и обоснование необходимости их модификации при переходе к последующему субкультивированию.

Получение каллусной культуры *T. wallichiana*

В качестве экспланта для получения каллусной культуры использовали одревесневшие побеги с иглами. Растительный материал был предоставлен академиком В. Н. Решетниковым (Центральный ботанический сад НАН Беларуси). Для стерилизации растительный материал обрабатывали детергентом 7Х, многократно промывали водопроводной и дистиллированной водой. Затем погружали в 0,1 % раствор сулемы (HgCl_2) на 10 минут и трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой с выдержкой по 20 минут. Подготовленные побеги разрезали на отрезки 0,7-1,5 см, листовые пластинки многократно надсекали скальпелем для увеличения раневой поверхности. Полученные экспланты помещали в чашки Петри в твердую питательную среду, пересадку первичного каллуса осуществляли через четыре недели. Для эксперимента использовали два варианта питательной среды Гамборга, отличающихся наличием антиоксиданта (1000 мг/л поливинилпирролидона (молекулярная масса 4000)) или сорбента (500 мг/л активированного угля) с добавлением α -НУК 4 мг/л и агара 5500 мг/л. Для дальнейшего поддержания каллуса использовали измененный гормональный состав среды: α -НУК – 2 мг/л, БАП – 0,3 мг/л.

Получение суспензионной культуры клеток *T. wallichiana*

Суспензионную культуру клеток получали из каллуса, культивируемого в течение шести месяцев. Для этого каллус переносили с твердой питательной среды в жидкую аналогичного состава без добавления агара. Культивирование проводили в темноте на качалке (100±10 об./мин) при температуре 26±1 °С и относительной влажности 70±5 %. Использовали колбы 250, 500 и 1000 мл с количеством питательной среды 40, 80 и 160 мл соответственно. В качестве инокулюма использовали упакованный объем 1 мл, 2 мл и 4 мл в зависимости от объема колбы. Цикл выращивания культуры составлял 21 сутки, после чего ее пересаживали в новую питательную среду. В дальнейшем, исходя из исследования ростовых характеристик, длительность одного цикла субкультивирования увеличили до 28 суток. Параметры роста культуры определяли традиционными методами [10].

Химический анализ биомассы

Химический анализ биомассы проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим детектором при ионизации

электрораспылением (ВЭЖХ-МС). Воздушно-сухую биомассу (40 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 96%-го этилового спирта в течение 30 минут на ультразвуке (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 11000 об./мин в течение 5 минут и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом при температуре 45 °С. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды и наносили на патрон для твердофазной экстракции Superclean ENVI-18 («Supelco», США). Патрон промывали 3 мл воды, аналиты смывали 3 мл этанола. Очищенный экстракт упаривали под вакуумом при 45 °С. Перед анализом пробы растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1 по объему).

ВЭЖХ-МС анализ проводили в хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Условия хроматографического разделения: колонка ACQUITY UPLC BEN Phenyl (50x2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, США), температура колонки – 40 °С, скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. Компоненты подвижной фазы: 0,1%-й (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1%-й (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, % по объему): 0-1 мин – 35 %, 1-7 мин – 35-45 %, 7-17 мин – 45 %. Анализ осуществляют в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100-1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120 °С, температура десольвации – 250 °С, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 600 л/час. Объем инъекции 1 мкл. Структурную идентификацию компонентов проводили на основании расшифровки результатов масс-спектрометрии (МС).

Результаты исследования

Экспланты тиса Валлиха инкубировали 28 суток, начало каллусогенеза наблюдали на 10-12 сутки (рис. 1). Процент каллусогенеза в обоих вариантах составил 85. Первичный каллус отделяли от остатков растительных эксплантов и переносили в свежую питательную среду. Дальнейший цикл выращивания культуры составлял 8 недель (56 суток). После третьего субкультивирования наблюдали значительное снижение скорости роста каллуса в варианте среды с активированным углем. В связи с этим в дальнейшем культуру поддерживали только в варианте среды с ПВП. К настоящему



а) в среде с ПВП;



б) в среде с активированным углем

Рис. 1. Каллусогенез *Taxus wallichiana*



Рис. 2. Каллусная культура клеток *Taxus wallichiana* после двух месяцев культивирования

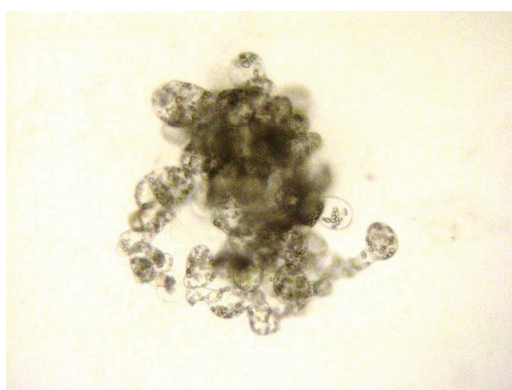


Рис. 3. Суспензионная культура клеток *Taxus wallichiana* (на 14-е сутки культивирования)

времени осуществлено 17 последовательных субкультивирований, каллусные культуры клеток (рис. 2) характеризуются стабильным ростом с индексом роста в пределах 4-5.

После переноса каллусной ткани в жидкую питательную среду к концу второго субкультивирования была получена суспензионная культура клеток тиса Валлиха. Она представляет собой популяцию некрупных агрегатов, состоящих из меристемоподобных клеток и одиночных паренхимных, слабо окрашена в розовый цвет (рис. 3). Следует отметить, что характерная для многих хвойных деревьев, в том числе и для всех видов рода *Taxus spp.*, невысокая интенсивность роста, как правило, сохраняется и в условиях культуры *in vitro*. Исходя из этого, в течение первого года выращивания длительность цикла культивирования составляла 21 сутки. Однако в дальнейшем, после детального изучения ростовых характеристик, продолжительность цикла культивирования была увеличена до 28 суток. Жизнеспособность суспензии в течение всего цикла выращивания составила в среднем 93 %, индекс роста культуры находился в пределах 8-9, что вдвое выше, чем у каллуса.

После получения стабильно растущих каллусной и суспензионной культур клеток *Taxus wallichiana* в них был проведен анализ состава таксоидов. По данным ВЭЖХ-МС анализа, в биомассе суспензионной культуры клеток *T. wallichiana* (24-е сутки выращивания в колбах) в основном присутствовали дитерпеноиды таксанового ряда, которые относятся к структурному типу тайванксана (14-гидроксированные таксоиды): синенксан В, синенксан С, таксуюннин С, 2,5,9,10,14-пента-ацетокси таксадиен, юннанксан и изомер 7-гидрокси-2,5,10,14-тетра-ацетокси таксадиена. В этих экспериментах идентификация соединений была основана на расшифровке результатов фрагментации их ионов-аддуктов $[M+NH_4]^+$ в источнике ионизации масс-селективного детектора (табл.) и сопоставлении их относительного хроматографического поведения с данными литературы [4-6].

В биомассе суспензионной культуры клеток *T. wallichiana* преобладающим (по данным ВЭЖХ-МС) таксоидом является юннанксан.

Таким образом, установлено, что при стандартном культивировании в биомассе суспензионной культуры клеток *T. wallichiana* преобладающими являются таксоиды, гидроксированные по С14 положению таксадиенового скелета. Следует заметить, что в культурах клеток других видов *Taxus spp.* как для полученных в наших предыдущих исследованиях [9], так и полученных другими авторами [5, 6, 11] также часто отмечается преобладание 14-ОН таксоидов, что позволяет предположить, что образование соединений этого типа является характерной чертой метаболизма таксановых дитерпеноидов в клетках *in vitro*.

При этом для разных видов тиса набор основных С14-ОН (отличающихся по

Таблица

**Результаты расшифровки ВЭЖХ-МС (ионизация электрораспылением,
детектирование положительных ионов) хроматограмм экстрактов
из биомассы суспензионной культуры клеток *T. wallichiana***

Идентифици- рованные таксоиды	Обнаруженные ионы, <i>m/z</i>			
	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	Другие ионы
Синенксан С	564,3402	569,3107	585,2830	445, 427, 385, 367, 343, 325, 301, 283, 265, 255, 161, 223, 209, 135, 133
Таксуюннанин С	522,2960	527,2620	543,2358	462, 445, 427, 403, 385, 343, 325, 301, 283, 265, 255, 161, 135, 209
2,5,9,10,14-пента- ацетокси таксадиен	580,3016	585,2709	601,2407	516, 543, 525, 503, 461, 443, 401, 383, 341, 323, 299, 281, 263, 359, 253, 161, 221
Юннанксан	580,3418	585,2886	601,2768	516, 543, 525, 503, 461, 443, 401, 385, 343, 325, 307, 301, 283, 265, 255, 161, 135
Изомер 7-гидрокси- 2,5,10,14-тетра- ацетокси таксадиена	538,3062	543,2529	559,2319	521, 461, 401, 359, 341, 299, 281, 263, 253, 279, 419
Синенксан В	536,3244	541,2673	557,2535	459, 417, 385, 343, 325, 283, 265, 255, 209, 301

характеру ацилирования гидроксильных групп в таксадиеновом скелете) таксоидов может, по всей видимости, не совпадать. Так, например, культуре клеток *T. wallichiana* основным является С14-ОН таксоид юннанксан. В то же время в культуре клеток *T. baccata* преобладающим является другой таксоид этой группы – синенксан С [12]. Однако, несмотря на различия в составе 14-ОН таксоидов в клетках разных видов *Taxus spp. in vitro*, полученные результаты позволяют предположить, что интенсивное (по сравнению с другими типами таксоидов, например, 13-гидроксильрованными таксоидами) образование этой группы таксоидов является специфичным биохимическим признаком дедифференцированных клеток тиса, культивируемых в асептических условиях. Причины, лежащие в основе этого явления, пока остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

Заключение

В результате проделанной работы были получены стабильные хорошо растущие каллусные и суспензионные культуры клеток тиса Валлиха *Taxus wallichiana*. В биомассе суспензионной культуры клеток обнаружено 6 соединений, относящихся к группе 14-гидроксильрованных таксоидов: стабильный рост полученных культур и наличие таксоидов в биомассе клеток позволяет проводить дальнейшие исследования по оптимизации условий и способов выращивания полученных культур клеток с целью улучшения их ростовых и биосинтетических характеристик и разработки на этой основе технологии получения востребованных противоопухолевых препаратов.

Литература

1. Wall M. E., Wani M. C. Recent progress in plant anti-tumor agents. // 153rd National Meeting of American Chemical Society, 1967, Paper M-006.
2. Chen W. M. Chemical constituents and biological activity of plants of *Taxus* genus. // Acta Pharm.Sin, 1990, 25. – p. 227.

3. Nadeem M., Rikhari H. C., Kumar A., Palni L. M., Nandi S. K. Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. // *Phytochemistry*, 2002; 60(6):627-31.
4. Madhusudanan K. P., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V. and Kumar S. MS/MS profiling of taxoids from the needles of *Taxus wallichiana*. *Phytochemical Analysis*. – 2002, 13, 18-30.
5. Zhao C. F., Yu L. J., Li L. Q. and Xiang F. Simultaneous identification and determination of major taxoids from extracts of *Taxus chinensis* cell cultures. // *Z Naturforsch*, 2007. – 62, 1-10.
6. Song G. H., Zhao C. F., Zhang M., Fu C. H., Zhang H. and Yu L. J. Correlation analysis of the taxane core functional group modification, enzyme expression, and metabolite accumulation profiles under methyl jasmonate treatment. // *Biotechnology Progress*, 2014. – 30, 269-280.
7. Sabater-Jara A. B., Tudela L. R., Lopez-Perez A. J. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. // *Phytochemistry reviews*. 2010. vol. 9, no 2. – pp. 343-356.
8. Zhong J.-J. Plant cell culture for production of Paclitaxel and other taxanes. // *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002, 94(6), 591-599.
9. Глоба Е. Б., Демидова Е. В., Туркин В. В., Макарова С. С., Носов А. М. Каллусогенез и получение суспензионных культур клеток четырех видов тиса: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* и *T. media*. // *Биотехнология*, 2009, (3):54-59.
10. Носов А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биологические методы в современной биологии растений. – М.: БИНOM, 2011. – С. 386-403
11. Menhard B., Eisenreich W., Hylands P. J., Bacher A. and Zenk M. H. Taxoids from Cell Cultures of *Taxus Chinensis*. // *Phytochemistry*. – 1998, 49, 113-125.
12. Kochkin D. V., Globa, E. B., Demidova E. V., Gaisinsky V. V., Galishev B. A., Kolotyrykina N. G., Kuznetsov V. V., Nosov A. M. Occurrence of 14-hydroxylated taxoids in the plant in vitro cell cultures of different yew species (*Taxus* spp.). *Dokl Biochem Biophys*. – 2017, 476, 337-339.

References

1. Wall M. E., Wani M. C. Recent progress in plant anti-tumor agents. // 153rd National Meeting of American Chemical Society, 1967, Paper M-006.
2. Chen W. M. Chemical constituents and biological activity of plants of *Taxus* genus. // *Acta Pharm.Sin*, 1990, 25. – p. 227.
3. Nadeem M., Rikhari H. C., Kumar A., Palni L. M., Nandi S. K. Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. // *Phytochemistry*, 2002; 60(6):627-31.
4. Madhusudanan K. P., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V. and Kumar S. MS/MS profiling of taxoids from the needles of *Taxus Wallichiana*. *Phytochemical Analysis*. – 2002, 13, 18-30.
5. Zhao C. F., Yu L. J., Li L. Q. and Xiang F. Simultaneous identification and determination of major taxoids from extracts of *Taxus chinensis* cell cultures. // *Z Naturforsch*, 2007. – 62, 1-10.
6. Song G. H., Zhao C. F., Zhang M., Fu C. H., Zhang H. and Yu L. J. Correlation analysis of the taxane core functional group modification, enzyme expression, and metabolite accumulation profiles under methyl jasmonate treatment. // *Biotechnology Progress*, 2014. – 30, 269-280.
7. Sabater-Jara A. B., Tudela L. R., Lopez-Perez A. J. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. // *Phytochemistry reviews*. 2010. vol. 9, no 2. – pp. 343-356.
8. Zhong J.-J. Plant cell culture for production of Paclitaxel and other taxanes. // *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002, 94(6), 591-599.
9. Globa E. B., Demidova E. V., Turkin V. V., Makarova S. S., Nosov A. M. Kallusogenez i poluchenie suspenzionnykh kul'tur kletok chetyrekh vidov tisa: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* i *T. media*. // *Biotehnologija*, 2009, (3):54-59.
10. Nosov A. M. Metody otsenki i kharakteristiki rosta kul'tur kletok vysshikh rastenii // Molekuliarno-geneticheskie i biologicheskie metody v sovremennoi biologii rastenii. – М.: БИНOM, 2011. – С. 386-403
11. Menhard B., Eisenreich W., Hylands P. J., Bacher A. and Zenk M. H. Taxoids from Cell Cultures of *Taxus Chinensis*. // *Phytochemistry*. – 1998, 49, 113-125.
12. Kochkin D. V., Globa, E. B., Demidova E. V., Gaisinsky V. V., Galishev B. A., Kolotyrykina N. G., Kuznetsov V. V., Nosov A. M. Occurrence of 14-hydroxylated taxoids in the plant in vitro cell cultures of different yew species (*Taxus* spp.). *Dokl Biochem Biophys*. – 2017, 476, 337-339.