

**УДК 58.07,57.047**

**ВЛИЯНИЕ БИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА СОДЕРЖАНИЕ  
ПРОТОБЕРБЕРИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ  
КЛЕТОК *THALICTRUM MINUS* L.**

*Осинова Е. А.*

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва,  
Россия  
E-mail: eleang@mail.ru*

Изучали влияние биотического стресса на биосинтез протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток *Thalictrum minus* L.. Элиситорами служили мицелиальные грибы *Aspergillus niger* и неидентифицированный гриб, выделенный после контаминации питательной среды. Проводили заражение живым мицелием на 0 и 10 сутки культивирования суспензионной культуры. Выявлена чувствительность культуры клеток растения к заражению *Aspergillus niger* только на 10 сутки культивирования. Реакция на стресс была выявлена через 2 часа после воздействия и усиливалась до 24 часов. Содержание протобербериновых алкалоидов за это время было повышено в 3 раза.

**Ключевые слова:** *Thalictrum minus*, культура клеток, протобербериновые алкалоиды, элиситация.

**ВВЕДЕНИЕ**

Василистник малый (*Thalictrum minus* L.) – лекарственное растение семейства лютиковых (*Ranunculaceae*). Широко распространено на территории России и в других странах средней полосы. Листья и корни растения применяются в тибетской медицине при отеках, водянке, женских болезнях. Трава василистника малого входит в состав сбора Здренко [1]. В василистнике малом найдены алкалоиды 1,2–1,3 %, среди которых значительная часть принадлежит берберину 1,1–1,2 % [2]. Берберин проявляет антимикробные свойства при лечении лейшманиоза, амёбной дизентерии, трихомоноза, малярии, холеры [3]. Изучены его желчегонные [4] и противоопухолевые [5, 6] свойства. Берберин проявляет антиоксидантную активность [6], рассматривается в качестве антидепрессанта [7]. Исследуется перспективность применения берберина для снижения уровня холестерина в крови [8, 9], болезни Альцгеймера [10, 11]. В культуре клеток растения василистника малого берберин может достигать 0,67 % от сухой массы клеток [12, 2]. Это ниже, чем в интактном растении. Однако это свойство неорганизованных пролиферирующих клеток растения, в которых содержание искомого вещества бывает, примерно, ниже на порядок, чем в органах целого растения [13]. Для повышения содержания вторичных веществ в культуре клеток применяют разные подходы. Изучают влияние регуляторов роста. Для повышения содержания берберина в культуре клеток василистника малого эффективным было воздействие цитокинином (6-бензиламинопурином) [14], который активировал ключевые

ферменты биосинтеза берберина норкоклаурин-6-О-метилтрансферазу и тетрагидропротобербериноксидазу [15, 16]. Возможно получение более продуктивных клеточных линий методами клеточной селекции на основании вариабельности клеточных популяций как по росту, так и по содержанию алкалоидов. Этим методом были получены более продуктивные клеточные линии василистника малого [17]. Применяются методы генетической трансформации. Для изменения уровня цитокининов, проводили агробактериальную трансформацию геном *ipt* (изопентенилтрансферазы), фермента биосинтеза цитокининов. Результаты таких экспериментов неоднозначны. Повышение артемизина на 30–70 % наблюдали в полученных регенерантах *Artemisia annua* L. [18]. В листьях регенерантов *asakura-sanshoo* изменялся состав эфирного масла: содержание оксигенированных сесквитерпеноидных соединений было выше, а ароматических соединений – ниже [19]. При оценке содержания вторичных веществ на уровне культуры клеток, оказалось, что оно бывает разным. Например, в *ipt*-трансгенных каллусных линиях *Catharantus roseus* содержание алкалоидов было ниже, чем в контрольном штамме [20]. В суспензионной культуре *Glycyrrhiza inflata* содержание флавоноидов не отличалось от контроля [21]. Повышение протобербериновых алкалоидов происходило в двух *ipt*-клеточных линиях василистника малого, полученных только от одного из двух исходных штаммов после агробактериальной трансформации [22]. Эффективным способом повышения вторичных соединений отмечено воздействие элиситорами. К ним относят несвойственные для растений молекулы, связанные с патогенами, другими вредителями (биотический стресс). Элиситоры вызывают усиление метаболизма и повышение биосинтеза веществ, приводящих к стресс-устойчивости [23]. В ответ на элиситоры показано повышение содержания вторичных соединений в культуре клеток лекарственных растений [24–27]. Влияние биотического стресса на культуру клеток василистника малого под воздействием мицелиальных грибов в литературе нет.

Цель наших исследований состояла в оценке содержания протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток *Thalictrum minus* L. в ответ на заражение мицелиальными грибами.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Thalictrum minus* L., штамм 233, полученный методом клеточной селекции [17] после продолжительного культивирования. Культуру клеток выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [28]. В среду добавляли витамины по прописи Стаба [29] 10 мл/л, 2,4-Д 0,01 мг/л, сахарозы 5 %. Выращивали в темноте, на качалке при 100 об/мин в колбах объемом 250 мл с заполнением средой 60 мл. Соотношение среды и инокулюма: 60 мл среды и 9 мл суспензии. Цикл субкультивирования 17 дней. Содержание протобербериновых алкалоидов определяли в культуральной жидкости. Отстаивали суспензию в пробирке объемом 10 мл, сливали верхнюю фракцию и центрифугировали ее при 8000 об/мин, 15 мин на центрифуге Опн (Россия). Спектрофотометрическое определение протобербериновых алкалоидов проводили на спектрофотометре UNICO (USA) при

длине волны 427 нм [30]. Для заражения использовали мицелиальный гриб *Aspergillus niger* и неидентифицированный мицелиальный гриб, выделенный после контаминации. Культуру клеток мицелиальных грибов поддерживали на среде, предназначенной для культуры клеток *Thalictrum minus* L. С агаром 1,5 % в пробирках при температуре 4 °С. В суспензионную культуру клеток растения вносили мицелий на кончике бактериальной петли в момент заражения. Для каждого варианта проводили три биологические повторности. Статистическую обработку проводили по стандартным методам.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост суспензионной культуры клеток *Thalictrum minus* L., штамма 233, при данных условиях культивирования, продолжительностью 3 недели. Масса клеток к этому времени достигает  $17,6 \pm 0,9$  г/л, содержание протобербербиновых алкалоидов в культуральной жидкости  $19,7 \pm 0,1$  мг/л. Это составляет  $90,7 \pm 0,5$  % всех протобербербиновых алкалоидов, остальная часть содержится в клетках. Проводили заражение суспензионной культуры мицелиальными грибами в разные сроки ростового цикла, в 0 точке (после переноса суспензии клеток растения на свежую среду) и на 10 сутки (середина ростового цикла).

**Таблица 1**  
Содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток *Thalictrum minus* L. после заражения мицелиальными грибами на 0 сутки культивирования, мг/л среды в культуральной жидкости

Вариант	контроль	<i>Aspergillus niger</i>	Неидентифицированный гриб
Время после заражения, сутки			
1	$6,3 \pm 0,8$	$4,5 \pm 2,0$	$5,9 \pm 1,5$
2	$19,6 \pm 3,6$	$6,4 \pm 0,5^*$	$7,9 \pm 2,3^*$
3	$8,3 \pm 0,4$	$4,7 \pm 1,1^*$	$15,1 \pm 2,4^*$
17	$16,1 \pm 1,1$	$32,8 \pm 8,0$	$23,5 \pm 9,3$

Примечание: Контроль – вариант без заражения. \*Разница достоверна ( $P < 0,05$ )

Реакцию на заражение мицелиальными грибами на 0 сутки культивирования суспензионной культуры *Thalictrum minus* L наблюдали только на вторые и третьи сутки. В случае заражения *Aspergillus niger* это было снижение содержания алкалоидов в 1,8–3,1 раза. В случае неизвестного гриба снижение, в 2,5 раза, наблюдали на вторые сутки после заражения, а на третьи, наоборот, повышение в 1,9 раза.

**Таблица 2**  
**Содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток**  
*Thalictrum minus* L. после заражения мицелиальными грибами на 10 сутки  
 культивирования, мг/л среды в культуральной жидкости

Вариант	контроль	<i>Aspergillus niger</i>	Неидентифицированный гриб
Время после заражения, сутки			
1	15.6±1,5	48.7±0,5*	11,8±1.8
2	9,1±1,4	7,4±1,6	13,1±7,4
3	14,1±2.8	8,1±2,1	11,9±1.8
7	19,9±0,6	7,2±0,9*	11,7±1.6

*Примечание:* Контроль – вариант без заражения. \*Разница достоверна ( $P < 0.05$ )

Реакции на заражение неидентифицированным мицелиальным грибом на 10 сутки культивирования суспензионной культуры *Thalictrum minus* L. не было. В случае заражения *Aspergillus niger* в первые сутки после заражения наблюдали превышение содержания алкалоидов в 3,1 раза по сравнению с контролем. Ко вторым суткам содержание алкалоидов резко снизилось в 6,6 раза и соответствовало контрольному уровню. На протяжении последующих суток (до семи после заражения и к 17 дню ростового цикла) содержание алкалоидов не менялось. По отношению к контролю на седьмой день после заражения и к 17 дню ростового цикла снижение алкалоидов было в 2,8 раз.

**Таблица 3**  
**Содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток**  
*Thalictrum minus* L. после заражения *Aspergillus niger* на 10 сутки  
 культивирования в течение первых суток после заражения, мг/л среды в  
 культуральной жидкости

Вариант	контроль	<i>Aspergillus niger</i>
Время после заражения, час		
2	5,1±0,9	10,1±0,8*
24	12,3±0,7	37,2±0,2*

*Примечание:* Контроль – вариант без заражения. \*Разница достоверна ( $P < 0.05$ )

Реакция на заражение *Aspergillus niger* в течение первых суток (2 часа и 24 часа) сопровождалась повышением содержания протобербербиновых алкалоидов в 2,0 и 3,0 раза, соответственно. В результате проведенных экспериментов можно было отметить, что суспензионная культура клеток была чувствительна к заражению мицелиальными грибами (биотический стресс). Это выражалось повышением

содержания протобербериновых алкалоидов в среде. Наиболее классически реакция представлена при заражении *Aspergillus niger*. Быстрая реакция в первые часы, что соответствует индуктивной фазе стресса, и следующая за ней фаза стресс-адаптации, сопровождающаяся снижением содержания алкалоидов в среде. К настоящему времени установлено, что элиситоры способствуют синтезу и накоплению вторичных метаболитов – продуктов защитной реакции. Элиситоры служат первичным сигналом и приводят в действие процессы индукции и регуляции неспецифического фитоиммунитета. Выраженным элиситорным действием грибов обладают глюканы и хитозаны из клеточных стенок грибов. Элиситоры связываются с рецепторами плазмалеммы. В передаче сигнала играют роль белки и небольшие молекулы салициловая, жасминовая кислоты, перекиси водорода, окиси азота. Эти молекулы функционально служат посредниками между рецепторами и клеточным ответом, который проявляется в перестройке метаболических процессов, повышают иммунитет растений [23]. К настоящему времени известны примеры интенсификации вторичных метаболитов с помощью элиситоров в культуре клеток растения [24–27]. Суспензионная культура *Thalictrum minus* L. была чувствительна к заражению мицелиальными грибами. Реакция на заражение проявлялась в первые часы и продолжалась на протяжении суток. Однако, значение имело в какой фазе ростового цикла культуры клеток происходило заражение. Эффективными были 10 сутки ростового цикла.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суспензионная культура *Thalictrum minus* L. чувствительна к биотическому стрессу (элиситации). Выявлены индуктивная фаза стресса, отмеченная через 2 часа после заражения, с продолжительностью до 24 часов, и последующей за ней фазы стресс-адаптации. Однако для выявления стресс реакции, следует учитывать возраст культуры клеток, в который будет проводиться заражение. Для суспензионной культуры клеток *Thalictrum minus* L. это были 10 сутки культивирования (середина ростового цикла). В результате можно получить увеличение содержания алкалоидов в 3 раза.

#### Список литературы

1. Гаммерман А. Ф. Лекарственные растения / Гаммерман А. Ф. Кадаев Г. Н., Яценко-Хмельевский А. А. – М.: Изд-во Высшая школа, 1990. – 544 с.
2. Сараев И. В. Химический состав василистника малого *Thalictrum minus* L. / Сараев И. В., Величко Н. А., Репях С. М. // Химия растительного сырья. – 2000. – No 1. – С. 37–39.
3. Холина А. Б. Культура клеток растений как источник проторбербериновых алкалоидов / Холина А. Б., Журавлев Ю. Н. // Растительные ресурсы. – 1996. – Вып. 1–2. – С. 134–148.
4. Максютин Н. П. Растительные лекарственные средства / Максютин Н. П., Комиссаренко Н. Ф., Прокопенко А. П., Погодина Л. И., Липкан Г. Н. – Киев.: Здоров'я, 1985. – 280 с.
5. Потопальский А. И. Барбарис и его препараты в биологии и медицине / Потопальский А. И., Петличная Л. И., Ивасивка С. В. – Киев.: Изд-во Наук. Думка, 1989. – 287 с.
6. Thirupurasundari C. J. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-inuced colon cancer in rat / Thirupurasundari C. J., Padmini R, Devaraj S. N. // Chemico-Biological Interactions. – 2009. – 177 – P. 190–195.

7. Kulkarni S. K. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride / Kulkarni S. K., Dhir A. // *European Journal of Pharmacology*. – 2008. – (589) – P. 163–172.
8. Kong W. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins / Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li J., Jiang J. D. // *Nat. Med.* – 2004. – 10. – P. 1344–1351. .
9. Jia X. Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rat / Jia X., Chen Y., Zidichouski J., Zhang J., Sun C., Wang Y. // *Atherosclerosis*. – 2008. – 201 – P. 101–107.
10. Jiang W. X. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases / Jiang W. X., Li S. H., Li X. J. // *Science China*. – 2015. – Vol. 58, No. 6 – P. 564–569.
11. De Oliveria J. S. Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer`s-like dementia: Involment of acetylcholinesterase and cell death / De Oliveria J. S., Abdalla F. H., Ph.D, Dornelles G. L., Adefegha S. A., Palma T. V., Signor C., Bernardi J. da S., Baldissarelli J., Lenz L. S., Magni L. P., Rubin M. A., Pillat M. M., Andrade C. M., Ph.D // *Neurotoxicology*. – 2016. – 57 – P. 241–250.
12. Ikuta A. Berberine and other protoberberine alkaloids in callus tissue of *Thalictrum minus* / Ikuta A., Itokawa H. // *Phytochem.* – 1982. – Vol. 21, No 6. – P. 1419–1421.
13. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения / Бутенко Р. Г. // *Культура клеток растений и биотехнология*. / М.: Изд-во Наука, 1986. – С. 3–20.
14. Nakagawa K. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. / Nakagawa K., Fukui H., and Tabata M. // *Plant Cell Report* – 1986. – 5 – P. 69–71.
15. Hara M. Induction of a specific methyltransferase activity regulating berberine biosynthesis by cytokinine in *Thalictrum minus* cell culture / Hara M., Tanaka S., Tabata M. // *Phytochem.* – 1994. – Vol. 36, No 2. – P. 327–33.
16. Hara M. Separation and characterization of cytokinin-inducible (S)-tetrahydroberberine oxidases controlling berberine biosynthesis in *Thalictrum minus* cell cultures / Hara M., Morio H., Tanaka S., Tabata M. // *Phytochem.* – 1995. – Vol. 38, No. 1. – P. 89–93.
17. Осипова Е. А. Вариабельность клеточных клонов *Thalictrum minus* in vitro. / Осипова Е. А., Цыбулько Н. С., Шамина Н. С. // *Физиология растений*. – 1999. – Т. 46, No 6. – С. 908–914.
18. Sa G. Effect of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. / Sa G., Mi M., He-chun Y., Ben-ye L., Guo-feng L., Kang C. // *Plant Science*. – 2001. – 160 – P. 691–698.
19. Zeng X. F. Expression of IPT in Asakura-sanshoo (*Xanthoxylum piperitum* (L) DC.f. *inerm*e Maki. / Zeng X. F., Zhao D. G. // *Plant Mol Biol Report*. – 2016. – 34 – P. 649–658.
20. Garnier F. Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible ipt gene / Garnier F., Carpin S., Label P., Creche J., Rideau M., Hadmi S. // *Plant Science*. – 1996. – 120 – P. 47–55.
21. Li Y. Stable transformation of suspension-cultured *Glycyrrhiza Inflata* batalin cells with *Agrobacterium tumefaciens* / Li Y., Li S., Dong Y., Zhang Y., Fu C., Yu L. // *Z. naturforsch C*. – 2012. – 67(11-12) – P. 603–610.
22. Осипова Е. А. Агробактериальная трансформация культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) / Осипова Е. А. // *Известия самарского научного центра Российской Академии Наук* – 2018. – Т. 20, No 5(3). – С. 447–455.
23. Карпун Н. Н. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе / Карпун Н. Н., Янушевская Э. Б., Михайлова Е. В. // *Сельскохозяйственная биология* – 2015. – Т. 50. N. 5. – С. 540–549.
24. Sasheva P. Methyl Jasmonate Induces Enhanced Podophyllotoxin Production in Cell Cultures of Thracian Flax (*Linum thracicum* ssp. *thracicum*) / Sasheva P., Ionkova I., Stoilova N. // *Nat Prod Commun* – 2015. – 10(7) – P. 1225–1228.
25. Manivannan A. Enhancement of Shikalkin Production in *Arnebia euchroma* Callus by a Fungal Elicitor, *Rhizoctonia solani*. / Manivannan A., Soundararajan P., Park Y. G., Jeong B. R. // *Iran J Biotechnol.* – 2015 – 13(4) – P. 10–16. doi: 10.15171/ijb.1058.
26. Arghavani P. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. /

- Arghavani P., Haghbeen K., Mousavi A. // *Int J Mol Sci* – 2016. – 17(3) – P. 399. doi: 10.3390/ijms17030399.
27. Mendosa D. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* / Mendosa D., Cuaspud O., Arias J. P., Ruiz O., Arias M. // *Biotechnol Rep (Amst)* – 2018. – 19 – e00273. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273. eCollection 2018 Sep 2018 Jul 3;19:e00273. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273. eCollection 2018 Sep.
28. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Murashige T. and Skoog F // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
29. Staba J. E. Plant tissue culture as a technique for the phytochemistry / Staba J. E // *Resent Adv. In Phytochem* – 1969. – 2 – P. 80.
30. Цыбулько Н. С. Метод определения протобербериновых алкалоидов в культуре ткани василистника / Цыбулько Н. С., Осипова Е. А. // *Хим.-фармацевт. журн.* – 1999. – Т. 33. – С. 34–36.

## INFLUENCE OF BIOTIC STRESS ON THE CONTENT OF PROTOBERBERINE ALKALOIDS IN THE SUSPENSION CULTURE OF *THALICTRUM MINUS* L. CELLS

*Osipova E. A.*

*K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia*  
*E-mail: eleang@mail.ru*

We studied the effect of biotic stress on the biosynthesis of protoberberine alkaloids in a suspension culture of *Thalictrum* cells minus L. The growth of the cell culture under these cultivation conditions was continued for 3 weeks. The cell mass by this time reached  $17,6 \pm 0,9$  g/l, the content of protoberberine alkaloids in the culture fluid  $19,7 \pm 0,1$  mg/l. This amounted to  $90,7 \pm 0,5$  % of all protoberberine alkaloids, the rest was contained in the cells. *Aspergillus niger* fungi and an unidentified fungus isolated after contamination served as elicitors. Live mycelium was infected at 0 (start of culture growth) and 10 days (mid-growth cycle) of suspension culture cultivation. The alkaloids were evaluated in the first three days after infection and by the 17<sup>th</sup> day of cell culture growth, which corresponded to the subculture cycle. After infection on day 0 of cultivation, differences from control were observed on the second and third day after infection. A decrease in the content of alkaloids by 1,8–3,1 times after infection with *Aspergillus niger* and on the second day by 2,5 times after infection with an unidentified fungus. By the third day, after infection with an unidentified fungus, on the contrary, there was an increase of 1,9 times. After infection on the 10th day of cultivation, there were no changes in alkaloids in the case of an unidentified fungus. After infection with *Aspergillus niger*, a quick reaction was noted during the first two hours and intensifying during the first day (induction phase of stress). During this time, there was an increase in the content of alkaloids in 2 and 3 times, respectively. The next phase of stress adaptation was accompanied by a decrease in the content of alkaloids to the control level (second and third days) and even lower by the 17<sup>th</sup> day of cultivation. Thus, the sensitivity of the *Thalictrum minus* cell culture to *Aspergillus niger* infection was revealed. The duration of the induction phase of the stress reaction (from two to 24 hours) and stress adaptation from two to 17 days were revealed.

The optimal age for detecting a stress reaction was 10 days of culturing a suspension culture of *Thalictrum minus* L. cells.

**Keywords:** *Thalictrum minus*, cell culture, protoberberine alkaloids, elicitation.

### References

1. Hammerman A. F., Kadaev G. N., Yatsenko-Khmelevsky A. A. Medicinal plants, 544 p. (M.: Higher School Publishing House, 1990).
2. Saraev I. V., Velichko N. A., Repyakh S. M. The chemical composition of the small cornflower *Thalictrum minus* L., *Chemistry of plant materials*, **1**, 37 (2000).
3. Kholina A. B., Zhuravlev Yu. N. Plant cell culture as a source of protorberberine alkaloids, *Plant resources*, **1-2**, 134 (1996).
4. Maksyutina N. P., Komissarenko N. F., Prokopenko A. P., Pogodina L. I., Lipkan G. N. *Herbal medicines*, 280 p. (Kiev.: Healthy, I, 1985).
5. Potopalsky A. I., Petlichnaya L. I., Ivasivka S. V. Barberry and its preparations in biology and medicine, 287 p. (Kiev.: Publishing House of Sciences. Dumka, 1989).
6. Thirupurasundari C. J., Padmini R., Devaraj S. N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-inuced colon cancer in rat, *Chemico-Biological Interactions*, **177**, 190 (2009).
7. Kulkarni S. K., Dhir A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride, *European Journal of Pharmacology*, **589**, 163 (2008).
8. Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li J., Jiang J. D. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins, *Nat. Med.*, **10**, 1344 (2004).
9. Jia X., Chen Y., Zidichouski J., Zhang J., Sun C., Wang Y. Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rat, *Atherosclerosis*, **201**, 101 (2008).
10. Jiang W. X., Li S. H., Li X. J. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases, *Science China*, **58**, **6**, 564 (2015).
11. De Oliveria J. S., Abdalla F. H., Ph.D, Dornelles G. L., Adefegha S. A., Palma T. V., Signor C., Bernardi J. da S., Baldissarelli J., Lenz L. S., Magni L. P., Rubin M. A., Pillat M. M., Andrade C. M., Ph.D Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: Involment of acetylcholinesterase and cell death, *Neurotoxicology*, **57**, 241 (2016).
12. Ikuta A., Itokawa H. Berberine and other protoberberine alkaloids in callus tissue of *Thalictrum minus*, *Phytochem.*, **21**, **6**, 1419 (1982).
13. Butenko R. G. Cell technologies for obtaining economically important substances of plant origin, *Plant cell culture and biotechnology*, Z-20. (M.: Publishing House of Science, 1986).
14. Nakagawa K., Fukui H., and Tabata M. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*., *Plant Cell Report*, **5**, 69 (1986).
15. Hara M., Tanaka S., Tabata M. Induction of a specific methyltransferase activity regulating berberine biosynthesis by cytokinine in *Thalictrum minus* cell culture, *Phytochem.*, **36**, **2**, 327 (1994).
16. Hara M., Morio H., Tanaka S., Tabata M. Separation and characterization of cytokinin-inducible (S)-tetrahydroberberine oxidases controlling berberine biosynthesis in *Thalictrum minus* cell cultures, *Phytochem.*, **38**, **1**, 89 (1995).
17. Osipova E. A., Tsibul'ko N. S. and Shamina Z. B. *In vitro* Variability of Cell Clones of *Thalictrum minus*, *Russian Journal of Plant Physiology.*, **46**, **6**, 908 (1999).
18. Sa G., Mi M., He-chun Y., Ben-ye L., Guo-feng L., Kang C. Effect of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L., *Plant Science.*, **160**, 691 (2001).
19. Zeng X. F., Zhao D. G. Expression of IPT in Asakura-sanshoo (*Xanthoxylum piperitum* (L) DC.f. *inerm* Maki., *Plant Mol Biol Report.*, **34**, 649 (2016).
20. Garnier F., Carpin S., Label P., Creche J., Rideau M., Hadmi S. Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with a light-inducible ipt gene, *Plant Science*, **120**, 47 (1996).

21. Li Y., Li S., Dong Y., Zhang Y., Fu C., Yu L. Stable transformation of suspension-cultured *Glycyrrhiza Inflata* batalin cells with *Agrobacterium tumefaciens*, *Z. naturforsch C.*, **67(11-12)**, 603 (2012)
22. Osipova E. A. Agrobacterial transformation of the cell culture of the small cornflower (*Thalictrum minus* L.), *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, **20, 5 (3)**, 447 (2018).
23. Karpun N. N., Yanushevskaya E. B., Mikhailova. Mechanisms of the formation of non-specific induced immunity in plants under biogenic stress, *Agricultural Biology*, **50, 5**, 540 (2015).
24. Sasheva P., Ionkova I., Stoilova N. Methyl Jasmonate Induces Enhanced Podophyllotoxin Production in Cell Cultures of Thracian Flax (*Linum thracicum* ssp. *thracicum*), *Nat Prod Commun*, **10(7)**, 1225 (2015).
25. Manivannan A., Soundararajan P., Park Y. G., Jeong B. R. Enhancement of Shikalkin Production in *Arnebia euchroma* Callus by a Fungal Elicitor, *Rhizoctonia solani.*, *Iran J Biotechnol*, **13(4)**, 10 (2015). doi: 10.15171/ijb.1058.
26. Arghavani P., Haghbeen K., Mousavi A. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch., *Int J Mol Sci.*, **17(3)**, 399 (2016). doi: 10.3390/ijms17030399.
27. Mendosa D., Cuaspuod O., Arias J. P., Ruiz O., Arias M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*, *Biotechnol Rep (Amst)*, **19**, e00273 (2018). doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273. eCollection 2018 Sep 2018 Jul 3;19:e00273. doi: 10.1016/j.btre.2018.e00273. eCollection 2018 Sep.
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473 (1962).
29. Staba J. E. Plant tissue culture as a technique for the phytochemistry, *Resent Adv. In Phytochem.*, **2**, 80 (1969).
30. Tsybulko N. S., Osipova E. A. Method for the determination of protoberberine alkaloids in the tissue culture of cornflower, *Chem.-pharmacist. Journal*, **33**, 34 (1999).