

УДК 573.6.086.835

СТИМУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЛИСИТОРОВ ДРОЖЖЕВОГО ЭКСТРАКТА

Г. В. НЕСТЕР¹⁾, Т. И. ДИТЧЕНКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследована способность 50–500 мг/л дрожжевого экстракта в качестве комплексного биотического элиситора индуцировать повышение уровней накопления вторичных метаболитов фенольной природы в суспензионных культурах клеток эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench), инициированных из каллусов листового и корневого происхождения. Установлено, что стимулирующий эффект компонентов дрожжевого экстракта более выражен для слабоагрегированной суспензионной культуры листового происхождения по сравнению с культурой корневого происхождения высокоагрегированного типа. Рост содержания фенилпропаноидов (в 2,5 раза) и флавоноидов (в 2,0 раза) в водно-спиртовых экстрактах из культуры листового происхождения в результате 2-суточного воздействия 100–500 мг/л дрожжевого экстракта коррелирует с увеличением их антирадикальной активности в модельной системе по ингибированию радикалов 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида. Экспозиция клеток суспензионных культур листового и корневого происхождения в присутствии 250–500 мг/л дрожжевого экстракта приводит к повышению активности ключевого фермента биосинтеза фенольных соединений L-фенилаланинаммоний-лиаза в 2,1–2,7 и 1,2–1,3 раза соответственно.

Ключевые слова: *Echinacea purpurea* L. Moench; суспензионная культура клеток; дрожжевой экстракт; фенольные соединения; гидроксикоричные кислоты; флавоноиды; антирадикальная активность; L-фенилаланинаммоний-лиаза.

Образец цитирования:

Нестер ГВ, Дитченко ТИ. Стимуляция биосинтеза вторичных метаболитов фенольной природы в суспензионных культурах клеток *Echinacea purpurea* L. Moench под влиянием элиситоров дрожжевого экстракта. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;2:37–48. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-37-48>

For citation:

Nester GV, Ditchenko TI. Stimulation of phenolic nature secondary metabolites biosynthesis in *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures under influence yeast extract elisitors. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;2: 37–48. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-2-37-48>

Авторы:

Гражина Владимировна Нестер – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – Т. И. Дитченко.
Татьяна Ивановна Дитченко – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Grazhina V. Nester, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. bio.nesterGV1@bsu.by
Tatyana I. Ditchenko, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. ditchenko@bsu.by

STIMULATION OF PHENOLIC NATURE SECONDARY METABOLITES BIOSYNTHESIS IN *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH SUSPENSION CELL CULTURES UNDER INFLUENCE YEAST EXTRACT ELISITORS

G. V. NESTER^a, T. I. DITCHENKO^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: T. I. Ditchenko (ditchenko@bsu.by)

The ability of 50–500 mg/L yeast extract as complex biotic elicitor to induce an increase in the accumulation of secondary phenolic metabolites in *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures initiated from calli of leaf and root origin was studied. The yeast extract stimulating effect is more pronounced for a weakly aggregated suspension culture of leaf origin compared with a root origin culture of highly aggregated type. The increase of phenylpropanoids (2.5 times) and flavonoids (2.0 times) content in aqueous-alcoholic extracts from leaf culture as a result of 2-day exposure to 100–500 mg/L of yeast extract correlates with their antiradical activity increase in model system for 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals inhibition. The exposure of suspension cell cultures of leaf and root origin in the presence of 250–500 mg/L yeast extract leads 2.1–2.7 and 1.2–1.3 times increase L-phenylalanine ammonium lyase activity as key enzyme of phenolic compounds biosynthesis.

Keywords: *Echinacea purpurea* L. Moench; suspension cell culture; yeast extract; phenolic compounds; hydroxycinnamic acids; flavonoids; antiradical activity; L-phenylalanine ammonium lyase.

Введение

Применение элиситоров является одной из стратегий метаболической инженерии, обеспечивающих повышение продукции вторичных метаболитов в культурах клеток, тканей и органов растений [1–5]. Биотические и абиотические элиситоры выступают в роли сигналов, которые запускают в обработанных клетках каскад реакций сигнальной трансдукции, приводящих к повышению экспрессии генов, контролируемых биосинтез фитоалексинов [2; 6–10]. Данная группа индуцибельных защитных соединений включает разные классы продуктов вторичного метаболизма, обладающих широким спектром антимикробного действия и представляющих интерес для фармацевтической промышленности в качестве терапевтических средств. Многочисленные исследования влияния элиситоров на синтез вторичных метаболитов культурами растительных клеток и тканей свидетельствуют, что их эффективность в значительной степени зависит от типа культуры, режима обработки, а также условий культивирования [1; 3; 7; 8; 11]. Для достижения максимальной элиситации крайне важно установить оптимальную концентрацию элиситора и продолжительность его воздействия. Кроме того, степень проявления стимулирующего эффекта зависит от возраста культуры, ее исходного биосинтетического потенциала, стадии ростового цикла, состава питательной среды, наличия дополнительных воздействий [1; 8; 11; 12]. Следует учитывать, что результат использования одного и того же элиситора может существенно отличаться для разных растительных объектов, культивируемых *in vitro*. В связи с этим определение оптимальных режимов обработки культур элиситорами является актуальной задачей при создании клеточных линий – продуцентов экономически важных биологически активных соединений.

К биотическим элиситорам относятся полисахариды, белки, гликопротеины, фрагменты клеточных стенок грибного и бактериального, а также растительного происхождения [1; 2; 4; 6; 13]. Наиболее широкое применение для усиления биосинтеза целевых метаболитов в культурах клеток и тканей растений получили грибные элиситоры [10–12; 14]. На практике часто используются комплексные неочищенные препараты и гомогенаты на основе грибных культур или их клеточных стенок, при этом молекулярная структура отдельных активных ингредиентов может быть неизвестна [12; 13]. Для получения препаратов элиситоров грибного происхождения, как правило, отбирают культуры в фазе логарифмического роста, биомассу которых подвергают сушке, а затем экстракции. Простерилизованный экстракт добавляют в питательные среды для культивирования растительных клеток и тканей. Источником элиситоров также может выступать культуральная среда для выращивания грибных штаммов [15], которую подвергают автоклавированию либо фильтрующей стерилизации. Реже проводят кратковременное совместное культивирование клеток, тканей и органов растений непосредственно с фитопатогенными грибами [1; 4; 16]. Одним из наиболее известных грибных элиситоров является дрожжевой экстракт (ДЭ), который представляет собой водорастворимую фракцию свободных пептидов и аминокислот, образующихся в результате автолиза клеток *Saccharomyces cerevisiae* под действием ферментов или при нагревании.

Биотехнологическим источником фенилпропаноидов с иммуностимулирующей, антиоксидантной, противовирусной и противовоспалительной активностью могут служить культуры клеток, тканей и органов *Echinacea purpurea* L. Moench [17–20]. Коллекция каллусных культур ценных лекарственных растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета БГУ включает длительно пассируемые гетеротрофные каллусные культуры *Echinacea purpurea* L. Moench, продуцирующие гидроксикоричные кислоты (ГКК) и их производные [21]. Показано, что в водно-этанольных экстрактах из каллусов эхинацеи, так же как и в надземной части интактных растений, доминирует цикориевая кислота [22]. Модификация минеральной основы питательной среды, концентрации источника углерода и регуляторов роста приводит к существенному возрастанию уровней накопления не только цикориевой, но и других производных кофейной кислоты, в частности кафтаровой, хлорогеновой [22; 23]. Поскольку биотехнологическое получение вторичных метаболитов растительного происхождения основано на использовании суспензионных культур [24], интерес представляют анализ биосинтетического потенциала суспензионных культур клеток *Echinacea purpurea* L. Moench и разработка приемов его повышения.

Целью настоящей работы явилась оценка способности ДЭ усиливать биосинтез вторичных метаболитов фенольной природы и повышать антирадикальную активность экстрактов из клеток суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили суспензионные культуры *Echinacea purpurea* L. Moench, иницированные из каллусных тканей разного происхождения (листового, корневого) и различающиеся по степени агрегированности. Суспензионная культура листового происхождения, представленная в основном одиночными клетками округлой формы и небольшими клеточными группами (до 10 клеток), являлась слабоагрегированной, тогда как суспензионная культура корневого происхождения, в которой преобладали многоклеточные агрегаты, состоящие из десятков клеток, относилась к высокоагрегированному типу. В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге – Скуга [25], включающая 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 1 мг/л кинетина и 1 мг/л β-индолил-3-уксусной кислоты. Величина pH питательных сред до автоклавирования составляла 5,8. Суспензионные культуры инкубировали в темноте при 25 °С. Постоянное перемешивание питательной среды обеспечивалось с помощью орбитального шейкера со скоростью вращения 120 об/мин. Продолжительность ростового цикла составляла 15 сут. Проавтоклавируемый водный маточный раствор ДЭ (10 мг/мл) добавляли в питательные среды до конечных концентраций 50; 100; 250 и 500 мг/л на 13-е сутки культивирования. Суспензионные культуры инкубировали в присутствии препарата элиситоров в течение 2 сут. Затем биомассу клеточных суспензий отделяли от питательной среды, отбирали навеску для оценки активности L-фенилаланинаммоний-лиазы (ФАЛ), оставшуюся часть высушивали и использовали для получения водно-спиртовых экстрактов, в которых определяли содержание вторичных метаболитов фенольной природы и антирадикальную активность (АРА).

Количественную оценку суммарного содержания фенольных соединений (ФС) в пересчете на феруловую кислоту производили на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина – Дениса, флавоноидов в пересчете на кверцетин – по реакции с $AlCl_3$ [26]. Содержание ГКК определяли в пересчете на цикориевую кислоту методом прямой спектрофотометрии согласно работе [27]. Для определения АРА экстрактов использовали метод, основанный на взаимодействии антиоксидантов, характеризующихся антирадикальными свойствами, со стабильным хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [28; 29]. Ингибирование свободных радикалов ДФПГ ($I_{ДФПГ}$) в процентах рассчитывали по формуле

$$I_{ДФПГ} = ((A - B)/A) \cdot 100,$$

где A – поглощение контрольной пробы; B – поглощение опытного образца, содержащего экстракт из суспензионной культуры.

Активность ФАЛ определяли согласно работе [30] и рассчитывали в наномолях коричной кислоты на 1 мг белка в час исходя из того, что изменение поглощения при 290 нм на 0,01 эквивалентно образованию 3,09 нмоль коричной кислоты. Содержание белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [31] с помощью калибровочной кривой, полученной для бычьего сывороточного альбумина.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы *Microsoft Excel*. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего ($Mean \pm SE$). Достоверность различий между контрольным и опытным образцами определяли на основе t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Наиболее выраженная элиситориндуцированная стимуляция вторичного метаболизма в культурах растительных клеток в большинстве случаев отмечается в поздней логарифмической фазе либо в начале стационарной фазы ростового цикла [12; 24]. В связи с этим внесение ДЭ в среду инкубации клеток суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench производили на 13-е сутки цикла выращивания (переход в стационарную фазу) [32]. В указанных условиях 2-суточная экспозиция клеток в присутствии 50–500 мг/л исследуемого элиситора индуцировала изменения уровней накопления суммы ФС в суспензионной культуре листового происхождения (рис. 1). Обработка клеток ДЭ в концентрациях 50 и 100 мг/л приводила к возрастанию суммарного содержания ФС на 28 и 51 % соответственно. Использование более высоких концентраций препарата элиситоров не сопровождалось усилением стимулирующего эффекта. В случае суспензионной культуры корневого происхождения достоверное повышение уровней накопления ФС отмечалось в присутствии только самой высокой из испытанных концентраций ДЭ – 500 мг/л. Таким образом, ответная реакция слабоагрегированной суспензионной культуры клеток *Echinacea purpurea* L. Moench листового происхождения на действие комплексного элиситора на основе гидролизата *Saccharomyces cerevisiae* проявлялась в гораздо большей степени по сравнению с реакцией высокоагрегированной культуры, инициированной из каллусов корневого происхождения.

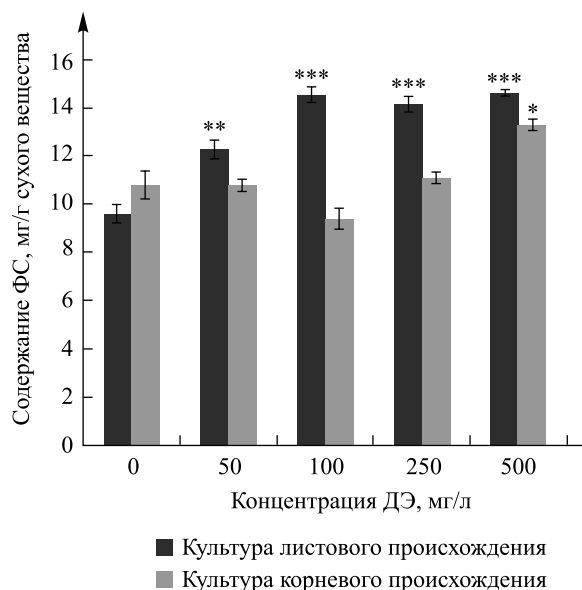


Рис. 1. Уровни накопления фенольных соединений в суспензионных культурах клеток *Echinacea purpurea* L. Moench разного происхождения в результате 2-суточной экспозиции в присутствии дрожжевого экстракта. Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ ($n = 9$)

Fig. 1. Accumulation levels of phenolic compounds in *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures of different origin in result yeast extract action during 2 d.

The significance of differences was calculated to the control:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ ($n = 9$)

Как уже отмечалось, доминирующей группой биологически активных соединений фенольного комплекса водно-спиртовых экстрактов из культур клеток и тканей *Echinacea purpurea* L. Moench являются фенолпропаноиды – ГКК и их производные, на основе которых синтезируются флавоноиды, кумарины, стильбены, лигнаны и др. Помимо фенолпропаноидов, эхинацея пурпурная содержит такие ценные ФС, как флавоноиды (кверцетин, кемпферол, лютеолин, апигенин, изорамнетин и их различные гликозиды) [33]. Для оценки элиситорной активности ДЭ в нашей работе были проанализированы изменения уровней накопления указанных выше классов ФС в обработанных клетках исследуемых суспензионных культур. В результате воздействия 100–500 мг/л ДЭ содержание ГКК и их производных в клетках суспензионной культуры листового происхождения возрастало в 2,5 раза относительно контрольного образца (рис. 2).

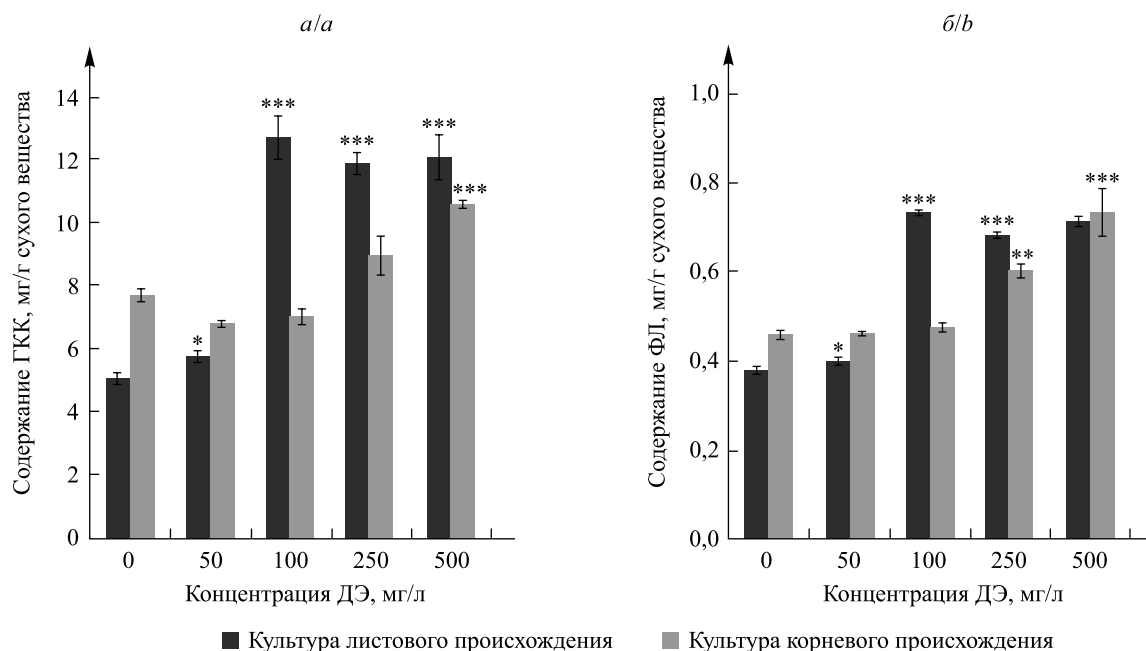


Рис. 2. Уровни накопления гидроксикоричных кислот (а) и флавоноидов (б) в суспензионных культурах клеток *Echinacea purpurea* L. Moench разного происхождения в результате 2-суточной экспозиции в присутствии дрожжевого экстракта.

Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ ($n = 9$)

Fig. 2. Accumulation levels of hydroxycinnamic acids (a) and flavonoids (b) in *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures of different origin in result yeast extract action during 2 d. The significance of differences was calculated to the control:

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ ($n = 9$)

Модификация биосинтетического потенциала в отношении флавоноидов под влиянием разных концентраций ДЭ имела аналогичный характер. Практически 2-кратное возрастание уровней накопления данных соединений отмечалось у суспензионной культуры листового происхождения при экспозиции в присутствии 100–500 мг/л препарата элиситоров. В клетках суспензионной культуры корневого происхождения, обработанных 500 мг/л ДЭ, рост содержания ГКК и их производных в среднем составил 36 %. Более низкие концентрации не вызывали достоверных изменений уровней их накопления. В отличие от ГКК рост содержания флавоноидов в клетках суспензионной культуры корневого происхождения отмечался в результате воздействия 250 мг/л ДЭ. Величина стимулирующего эффекта составила 1,3 раза. В присутствии 500 мг/л гидролизата дрожжей уровни накопления флавоноидов были в 1,6 раза выше, чем в необработанных клетках.

Способность ДЭ индуцировать усиление биосинтеза вторичных метаболитов разных классов в культурах растительных клеток и тканей, генетически трансформированных корней показана на примере алкалоидов [34; 35], изопреноидов [36–38], а также ФС [39]. Под действием данного биотического элиситора отмечалась выраженная стимуляция фенольного метаболизма, в частности продукции изофлавонов клетками суспензионной культуры *Psoralea corylifolia* L. [40], суммы ФС клетками суспензионной культуры *Astragalus chrysochlorus* [41], лигнанов культурой клеток *Linum album* [42], фенилпропаноидов суспензионной культурой *Hypericum perforatum* L. [43], фенолокислот культурой адвентивных побегов *Eryngium planum* L. [44], розмариновой кислоты культурой генетически трансформированных корней *Salvia miltiorrhiza* [45] и др. Следовательно, полученные для суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench результаты доказывают возможность участия компонентов ДЭ в реализации неспецифических адаптивных реакций растительных клеток, приводящих к усилению биосинтеза фитоалексинов.

Подавляющее большинство известных ФС синтезируются по шикиматному пути. Специфические реакции вторичного метаболизма, ведущие к биосинтезу ФС, начинаются с дезаминирования L-фенилаланина, катализируемого центральным ферментом фенилпропаноидного метаболизма – ФАЛ. В результате образуется коричная кислота, которая хотя и не является фенольным соединением (не содержит обязательной для всех фенолов гидроксогруппы в циклической части молекулы), но дает начало различным ГКК – *пара*-кумаровой (оксикоричной), кофейной, феруловой, синаповой кислотам. В связи

с этим представляло интерес оценить степень модификации функционирования ФАЛ в клетках суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench, подвергнутых воздействию ДЭ. Активность указанного фермента последовательно возрастала при повышении концентрации ДЭ от 100 до 500 мг/л в среде инкубации суспензионной культуры, иницированной из каллусов листового происхождения (рис. 3). Стимулирующий эффект для суспензионной культуры корневого происхождения был зарегистрирован при экспозиции клеток в присутствии 250–500 мг/л препарата элиситоров. В максимальной из испытанных концентраций ДЭ индуцировал повышение активности ФАЛ в суспензионной культуре листового происхождения в 2,7 раза, корневого – в 1,3 раза. Менее выраженная способность ДЭ в концентрациях 100–250 мг/л стимулировать работу ключевого фермента биосинтеза ФС в клетках суспензионной культуры корневого происхождения, вероятно, является причиной ее более низкого продукционного потенциала в отношении ГKK и флавоноидов (см. рис. 2).

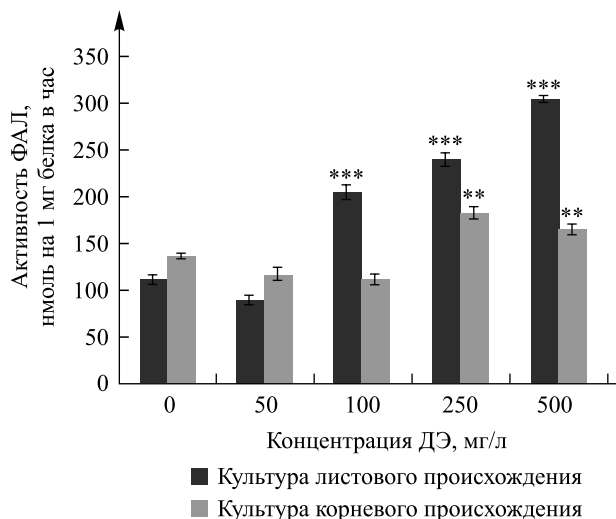


Рис. 3. Активность L-фенилаланинаммоний-лиазы в суспензионных культурах клеток *Echinacea purpurea* L. Moench разного происхождения в результате 2-суточной экспозиции в присутствии дрожжевого экстракта. Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ ($n = 9$)

Fig. 3. The activity of L-phenylalanine ammonium lyase in *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures of different origin in result yeast extract action during 2 d. The significance of differences was calculated to the control: ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ ($n = 9$)

Достаточно хорошо выраженная корреляция между активностью ФАЛ и уровнями накопления ГKK и их производных проявлялась как для листовой ($r = 0,88$), так и для корневой ($r = 0,83$) суспензионной культуры. Степень положительной корреляции между активностью ФАЛ и содержанием флавоноидов снижалась для суспензионной культуры клеток корневого происхождения ($r = 0,78$) и не претерпевала изменений для культуры листового происхождения ($r = 0,89$). Следовательно, стимуляция продукции ГKK исследуемыми суспензионными культурами клеток *Echinacea purpurea* L. Moench в результате воздействия элиситоров ДЭ обусловлена повышением активности ФАЛ как ключевого фермента биосинтеза указанных соединений.

Как известно, многие ФС являются мощными антиоксидантами. Окислительный стресс выступает патогенетическим фактором развития многих заболеваний и патофизиологических процессов (воспаление, атеросклероз, канцерогенез, диабет и др.), поэтому получение эффективных природных антиоксидантов является актуальной задачей. Антиоксидантная активность фенолокислот связана с наличием в их структуре подвижных атомов водорода в гидроксильных группах, которые легко отдают этот атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. В результате образуются феноксильные радикалы, обладающие меньшей реакционной активностью и способные прерывать цепной механизм окисления [46; 47]. Наиболее простой и удобной моделью для оценки АРА веществ является реакция со свободным стабильным радикалом ДФПГ, который, взаимодействуя с молекулой антиоксиданта, переходит в нерадикальную форму. В нашей работе для определения АРА с помощью ДФПГ получали серию разведений (в 2,5–100,0 раза) водно-спиртовых экстрактов из клеток исследуемых суспензионных культур, обработанных ДЭ. В случае культуры листового происхождения наиболее резкое возрастание ингибирующего эффекта отмечалось при повышении концентрации экстрактов от 0,01 до 0,10 % в результате воздействия 100–500 мг/л ДЭ (рис. 4, а).

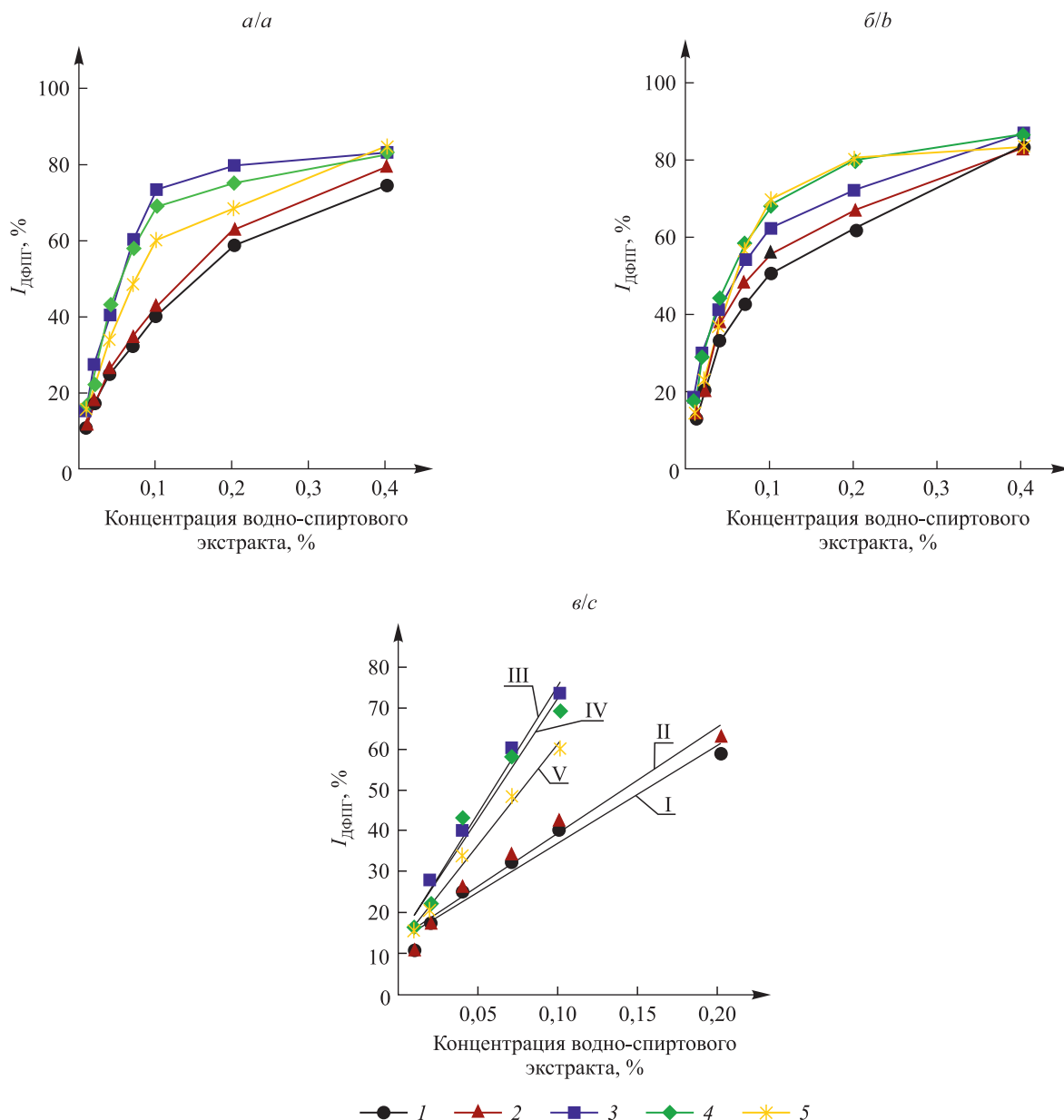


Рис. 4. Зависимости ингибирования радикалов ДФПГ от концентрации водно-спиртовых экстрактов из клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* L. Moench листового (а, в) и корневого (б) происхождения в результате 2-суточной экспозиции в присутствии дрожжевого экстракта: I – контроль; 2 – 50 мг/л ДЭ; 3 – 100 мг/л ДЭ; 4 – 250 мг/л ДЭ; 5 – 500 мг/л ДЭ. Представлены средние значения (маркеры) и линии тренда, построенные на основании уравнения регрессии (y), а также величин достоверности аппроксимации (R^2): I – $y = 243,06x + 13,142$ ($R^2 = 0,9688$); II – $y = 263,99x + 13,524$ ($R^2 = 0,9677$); III – $y = 632,96x + 13,078$ ($R^2 = 0,9822$); IV – $y = 599,82x + 13,209$ ($R^2 = 0,9629$); V – $y = 505,04x + 11,618$ ($R^2 = 0,9906$).

Величины ошибок средних значений не превышают 5 %

Fig. 4. Dependences of DPPH radicals inhibition on concentration of water-alcohol extracts from *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell culture of leaf (a, c) and root (b) origin in result of 2-day exposure in the presence of yeast extract: 1 – control; 2 – 50 mg/L yeast extract; 3 – 100 mg/L yeast extract; 4 – 250 mg/L yeast extract; 5 – 500 mg/L yeast extract. Data presented by markers, trend line are based on regression equation (y) and significantly approximate by R^2 coefficient: I – $y = 243.06x + 13.142$ ($R^2 = 0.9688$); II – $y = 263.99x + 13.524$ ($R^2 = 0.9677$); III – $y = 632.96x + 13.078$ ($R^2 = 0.9822$); IV – $y = 599.82x + 13.209$ ($R^2 = 0.9629$); V – $y = 505.04x + 11.618$ ($R^2 = 0.9906$). Error values of averages don't exceed 5 %

Подобный характер имели концентрационные зависимости ингибирования радикалов ДФПГ для контрольного и всех опытных образцов экстрактов, полученных из культуры корневого происхождения (рис. 4, б). В целях сравнительной оценки АРА разных образцов обычно используют величину IC_{50} – концентрацию, при которой наблюдается 50 % ингибирование радикалов ДФПГ. Для определения IC_{50} были проанализированы концентрационные зависимости ингибирования ДФПГ, для которых проводили аппроксимацию данных в области полумаксимального ингибирования линейной функцией, как показано на рис. 4, в, на примере суспензионной культуры листового происхождения.

Проведенный анализ величин IC_{50} свидетельствует, что в контроле водно-спиртовой экстракт из суспензионной культуры корневого происхождения характеризуется более высокой АРА. Воздействие компонентов ДЭ приводило к возрастанию антирадикальных свойств получаемых экстрактов. Самое низкое значение IC_{50} выявлено у экстракта из суспензионной культуры листового происхождения, обработанной 100 мг/л ДЭ.

Влияние дрожжевого экстракта на величины IC_{50} водно-спиртовых экстрактов из клеток суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench в реакции с ДФПГ

Influence of yeast extract on IC_{50} values of water-alcohol extracts from *Echinacea purpurea* L. Moench suspension cell cultures determined using the DPPH assay

Концентрация ДЭ, мг/л	IC_{50} , %	
	Экстракт из культуры листового происхождения	Экстракт из культуры корневого происхождения
0	0,152 ± 0,011	0,091 ± 0,011
50	0,138 ± 0,008	0,079 ± 0,006
100	0,058 ± 0,004	0,076 ± 0,005
250	0,061 ± 0,003	0,070 ± 0,007
500	0,076 ± 0,007	0,073 ± 0,006

Таким образом, 2-суточная экспозиция клеток суспензионных культур в присутствии 100–500 мг/л ДЭ приводила к существенному возрастанию в получаемых экстрактах количества соединений с антирадикальными свойствами. Изменения АРА экстрактов из суспензионной культуры *Echinacea purpurea* L. Moench листового происхождения, инкубируемых в присутствии разных концентраций ДЭ, коррелировали с уровнями накопления отдельных групп ФС – ГKK и флавоноидов ($r = 0,98$). В случае суспензионной культуры корневого происхождения положительная корреляция между указанными показателями отсутствовала.

Заключение

Характер воздействия препарата элиситоров ДЭ на клетки суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench зависит от его концентрации и типа культуры. Различия в степени агрегированности и исходном биосинтетическом потенциале исследуемых суспензионных культур листового и корневого происхождения обуславливают особенности проявления стимулирующего действия ДЭ на уровни накопления фенилпропаноидов и флавоноидов. Как известно, высокая агрегированность суспензионных культур приводит к значительной гетерогенности химического микроокружения составляющих ее клеток, тогда как в слабоагрегированной суспензионной культуре практически все клетки в одинаковой степени «открыты» для внешнего воздействия. Показано, что эффективность применения данного биотического элиситора гораздо выше для слабоагрегированной суспензионной культуры листового происхождения, которая изначально характеризовалась более низким содержанием ГKK по сравнению с культурой корневого происхождения. Воздействие 100–500 мг/л ДЭ индуцировало существенное усиление биосинтеза ГKK, в результате чего их доля в комплексе вторичных метаболитов фенольной природы возрастала до 82–87 % (в контроле в среднем 50–51 %). Одновременно с этим наблюдалась стимуляция образования флавоноидов, однако их удельный вес не превышал 5 % от суммарного содержания ФС. Таким образом, резкое возрастание уровней накопления ГKK при 2-суточной экспозиции клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* L. Moench листового происхождения в присутствии ДЭ отражает первичную и наиболее чувствительную реакцию, представляющую комплекс биохимических изменений в цепочке биосинтеза индуцибельных защитных соединений фенольной природы. Для суспензионной культуры корневого происхождения, отличающейся преобладанием фракции многоклеточных агрегатов и изначально более высоким содержанием исследуемых вторичных метаболитов, стрессовая реакция, индуцируемая компонентами ДЭ, проявлялась в меньшей степени.

В основе стимулирующего воздействия компонентов ДЭ на продукционный потенциал суспензионных культур *Echinacea purpurea* L. Moench лежит повышение активности ФАЛ. Установленные особенности модуляции работы данного фермента элиситорами ДЭ в культурах разного происхождения определяют различия в уровнях накопления ГKK и флавоноидов. Усиление их биосинтеза в обработанных ДЭ клетках суспензионной культуры листового происхождения коррелирует с ростом АРА получаемых на их основе экстрактов. Отсутствие подобной корреляции в случае суспензионной культуры корневого происхождения указывает на то, что проявление антирадикальных свойств получаемых экстрактов определяется содержанием не только фенилпропаноидов и флавоноидов, но и других групп вторичных метаболитов.

Библиографические ссылки

1. Angelova Z, Georgiev S, Roos W. Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2006;20(2):72–83. DOI: 10.1080/13102818.2006.10817345.
2. Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioski M, Cusidó RM, et al. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* [Internet]. 2016 [cited 2020 March 1];21(2):182. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/182/pdf>. DOI: 10.3390/molecules21020182.
3. Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158. DOI: 10.5483/bmbrep.2016.49.3.264.
4. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: a biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*. 2019;19(12):880–895. DOI: 10.1002/elsc.201900058.
5. Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma MP, Rajasekharan PE, Zafar N, et al. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2018;132(2):239–265. DOI: 10.1007/s11240-017-1332-2.
6. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 2007;172(5):861–875. DOI: 10.1016/j.plantsci.2007.01.006.
7. Baenas N, García-Viguera C, Moreno DA. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* [Internet]. 2014 [cited 2020 March 1];19(9):13541–13563. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/13541/pdf>. DOI: 10.3390/molecules190913541.
8. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*. 2007;1(1):69–79.
9. Mishra AK, Sharma K, Misra RS. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*. 2012;7(2):95–120. DOI: 10.1080/17429145.2011.597517.
10. Zhai X, Jia M, Chen L, Zheng C-J, Rahman K, Han T, et al. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017;43(2):238–261. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1201041.
11. Naik PM, Al-Khayri JM. Abiotic and biotic elicitors – role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. In: Shanker AK, Shanker C, editors. *Abiotic and biotic stress in plants: recent advances and future perspectives*. Rijeka: InTech; 2016. p. 247–277. DOI: 10.5772/61442.
12. Baldi A, Srivastava AK, Bisaria VS. Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures. In: Varma A, Kharkwal AC, editors. *Symbiotic fungi: principles and practice*. Berlin: Springer-Verlag; 2009. p. 373–380. (Soil Biology; volume 18). DOI: 10.1007/978-3-540-95894-9_23.
13. Соколов ЮА. Элиситоры и их применение. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя хімічных навук*. 2014; 4:109–121.
14. Shasmita, Singh NR, Rath SK, Behera S, Naik SK. *In vitro* secondary metabolite production through fungal elicitation: an approach for sustainability. In: Prasad R, Kumar V, Kumar M, Wang S, editors. *Fungal nanobionics: principles and applications*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2018. p. 215–242. DOI: 10.1007/978-981-10-8666-3_9.
15. Netala VR, Kotakadi VS, Gaddam SA, Ghosh SB, Tartte V. Elicitation of gymnemic acid production in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. through endophytic fungi. *3 Biotech* [Internet]. 2016 [cited 2020 March 1];6(2):232. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13205-016-0555-y>. DOI: 10.1007/s13205-016-0555-y.
16. Tonk D, Mujib A, Maqsood M, Ali M, Zafar N. *Aspergillus flavus* fungus elicitation improves vincristine and vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2016;126(2):291–303. DOI: 10.1007/s11240-016-0998-1.
17. Parsons JL, Cameron SI, Harris CS, Smith ML. *Echinacea* biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical Biology*. 2018;56(1):485–494. DOI: 10.1080/13880209.2018.1501583.
18. Murthy HN, Kim Y-S, Park S-Y, Paek K-Y. Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of *Echinacea* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(18):7707–7717. DOI: 10.1007/s00253-014-5962-6.
19. Abbasi BH, Liu R, Saxena PK, Liu C-Z. Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified airlift bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009;84(11):1697–1701. DOI: 10.1002/jctb.2233.
20. Ramezannezhad R, Aghdasi M, Fatemi M. Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of *Echinacea purpurea* by silver nanoparticle elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019;139(2):261–273. DOI: 10.1007/s11240-019-01678-4.
21. Юрин ВМ, Дитченко ТИ, Филиппова СН, Молчан ОВ, Логвина АО, Глушакова ДЮ и др. Коллекции каллусных культур лекарственных растений. В: *Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси; 6–8 июня 2017 г.; Минск, Беларусь. Часть I*. Минск: Медисонт; 2017. с. 481–486.
22. Дитченко ТИ, Шабуня ПС, Фатыхова СА, Молчан ОВ, Юрин ВМ. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017;7(2):55–63. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-55-63.

23. Дитченко ТИ, Юрин ВМ. Регуляция продукции вторичных метаболитов фенольной природы каллусной культурой *Echinacea purpurea* L. Moench корневого происхождения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018; 2:57–64.
24. Yue W, Ming Q-L, Lin B, Rahman K, Zheng C-J, Han T, et al. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(2):215–232. DOI: 10.3109/07388551.2014.923986.
25. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Запорожцев МН. Фенольные соединения и методы их исследования. В: Павлинова ОА, редактор. *Биохимические методы в физиологии растений*. Москва: Наука; 1971. с. 185–197.
27. Куркин ВА, Авдеева ОИ, Авдеева ЕВ, Мизина ПГ. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea*. *Растительные ресурсы*. 1998;34(2):81–85.
28. Волков ВА, Дорофеева НА, Пахомов ПМ. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений. *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(6):27–31.
29. Филиппенко ТА, Белая НИ, Николаевский АН. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом. *Химико-фармацевтический журнал*. 2004;38(8):34–36.
30. Zucker M. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiology*. 1968;43(3):365–374. DOI: 10.1104/pp.43.3.365.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
32. Юрин ВМ, Дитченко ТИ, Филиппова СН, Ключанкова МВ, Логвина АО. Характеристика суспензионной культуры как объекта для промышленного производства фармакологически активных веществ. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2016;11(1):9–31.
33. Куркин ВА, Акушская АС, Авдеева ЕВ, Вельямкина ЕИ, Давя ЕД, Каденцев ВИ. Флавоноиды травы эхинацеи пурпурной. *Химия растительного сырья*. 2010;4:87–89.
34. Loc NH, Anh NHT, Khuyen LTM, An TNT. Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. *Journal of BioScience and Biotechnology* [Internet]. 2014 [cited 2020 March 1];3(1):1–6. Available from: [http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352484/jbb_2014-3\(1\)-pages_1-6.pdf](http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352484/jbb_2014-3(1)-pages_1-6.pdf).
35. Correa-Higuera LJ, Sepúlveda-García EB, Ponce-Noyola T, Trejo-Espino JL, Jiménez-Aparicio AR, Luna-Palencia GR, et al. Glucoindole alkaloid accumulation induced by yeast extract in *Uncaria tomentosa* root cultures is involved in defense response. *Biotechnology Letters*. 2019;41(10):1233–1244. DOI: 10.1007/s10529-019-02714-1.
36. Yuan Y-J, Li C, Hu Z-D, Wu J-C, Zeng A-P. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. *Process Biochemistry*. 2002;38(2):193–198. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00071-7.
37. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*. 2007;29(7):1143–1146. DOI: 10.1007/s10529-007-9368-8.
38. Xu X, Hu X, Neill SJ, Fang J, Cai W. Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant and Cell Physiology*. 2005;46(6):947–954. DOI: 10.1093/pcp/pci103.
39. Roat C, Ramawat KG. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnology Reports*. 2009;3(2):135–138. DOI: 10.1007/s11816-009-0082-y.
40. Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009;14(5):612. DOI: 10.1007/s12257-008-0316-9.
41. Cakir O, Ari S. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. *Journal of Environmental Biology*. 2009;30(1):51–55.
42. Bahabadi SE, Sharifi M, Behmanesh M, Safaie N, Murata J, Araki R, et al. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(5):487–491. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.12.006.
43. Gadzovska Simic S, Tusevski O, Maury S, Hano C, Delaunay A, Chabbert B, et al. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015;122(1):213–226. DOI: 10.1007/s11240-015-0762-y.
44. Kikowska M, Kędziora I, Krawczyk A, Thiem B. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. *Acta Biochimica Polonica*. 2015;62(2):197–200. DOI: 10.18388/abp.2014_880.
45. Yan Q, Shi M, Ng J, Wu JY. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*. 2006;170(4):853–858. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.12.004.
46. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2004;108(22):4916–4922. DOI: 10.1021/jp037247d.
47. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* [Internet]. 2019 [cited 2020 March 1];24:e00370. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2215017X19302383?token=67262F1C86CB4FEDE5B5D42FA891AC21D1B658CF599F9A2C4845FA40EA3101F18397AD015842CE2B786C7B-C7A4E20FE9>. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00370.

References

1. Angelova Z, Georgiev S, Roos W. Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2006;20(2):72–83. DOI: 10.1080/13102818.2006.10817345.
2. Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, et al. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* [Internet]. 2016 [cited 2020 March 1];21(2):182. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/182/pdf>. DOI: 10.3390/molecules21020182.
3. Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong S, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*. 2016;49(3):149–158. DOI: 10.5483/bmbrep.2016.49.3.264.

4. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: a biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*. 2019;19(12):880–895. DOI: 10.1002/elsc.201900058.
5. Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma MP, Rajasekharan PE, Zafar N, et al. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2018;132(2):239–265. DOI: 10.1007/s11240-017-1332-2.
6. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 2007;172(5):861–875. DOI: 10.1016/j.plantsci.2007.01.006.
7. Baenas N, García-Viguera C, Moreno DA. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* [Internet]. 2014 [cited 2020 March 1];19(9):13541–13563. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/13541/pdf>. DOI: 10.3390/molecules190913541.
8. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*. 2007;1(1):69–79.
9. Mishra AK, Sharma K, Misra RS. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*. 2012;7(2):95–120. DOI: 10.1080/17429145.2011.597517.
10. Zhai X, Jia M, Chen L, Zheng C-J, Rahman K, Han T, et al. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medicinal plants. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017;43(2):238–261. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1201041.
11. Naik PM, Al-Khayri JM. Abiotic and biotic elicitors – role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. In: Shanker AK, Shanker C, editors. *Abiotic and biotic stress in plants: recent advances and future perspectives*. Rijeka: InTech; 2016. p. 247–277. DOI: 10.5772/61442.
12. Baldi A, Srivastava AK, Bisaria VS. Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures. In: Varma A, Kharkwal AC, editors. *Symbiotic fungi: principles and practice*. Berlin: Springer-Verlag; 2009. p. 373–380. (Soil Biology; volume 18). DOI: 10.1007/978-3-540-95894-9_23.
13. Sokolov YuA. Elicitors and their application. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*. 2014;4:109–121. Russian.
14. Shasmita, Singh NR, Rath SK, Behera S, Naik SK. *In vitro* secondary metabolite production through fungal elicitation: an approach for sustainability. In: Prasad R, Kumar V, Kumar M, Wang S, editors. *Fungal nanobionics: principles and applications*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2018. p. 215–242. DOI: 10.1007/978-981-10-8666-3_9.
15. Netala VR, Kotakadi VS, Gaddam SA, Ghosh SB, Tartte V. Elicitation of gymnemic acid production in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. through endophytic fungi. *3 Biotech* [Internet]. 2016 [cited 2020 March 1];6(2):232. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-016-0555-y>. DOI: 10.1007/s13205-016-0555-y.
16. Tonk D, Mujib A, Maqsood M, Ali M, Zafar N. *Aspergillus flavus* fungus elicitation improves vincristine and vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2016;126(2):291–303. DOI: 10.1007/s11240-016-0998-1.
17. Parsons JL, Cameron SI, Harris CS, Smith ML. *Echinacea* biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical Biology*. 2018;56(1):485–494. DOI: 10.1080/13880209.2018.1501583.
18. Murthy HN, Kim Y-S, Park S-Y, Paek K-Y. Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of *Echinacea* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(18):7707–7717. DOI: 10.1007/s00253-014-5962-6.
19. Abbasi BH, Liu R, Saxena PK, Liu C-Z. Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified airlift bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009;84(11):1697–1701. DOI: 10.1002/jctb.2233.
20. Ramezannezhad R, Aghdasi M, Fatemi M. Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of *Echinacea purpurea* by silver nanoparticle elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019;139(2):261–273. DOI: 10.1007/s11240-019-01678-4.
21. Yurin VM, Ditchenko TI, Filipava SN, Molchan OV, Lohvina HO, Glushakova DYU, et al. Collection of callus cultures of medicinal plants. In: *Role of botanical gardens and arboreta in conservation, investigation and sustainable using diversity of the plant world. Proceedings of the International conference dedicated to 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus; 2017 June 6–8; Minsk, Belarus. Part I*. Minsk: Medisont; 2017. p. 481–486. Russian.
22. Ditchenko TI, Shabunya PS, Fatykhova SA, Molchan OV, Yurin VM. Analysis of caffeic acid derivatives in *Echinacea purpurea* callus culture. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):55–63. Russian. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-55-63.
23. Ditchenko TI, Yurin VM. Regulation of phenolic secondary metabolites production by *Echinacea purpurea* L. Moench callus culture of root origin. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:57–64. Russian.
24. Yue W, Ming Q-L, Lin B, Rahman K, Zheng C-J, Han T, et al. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(2):215–232. DOI: 10.3109/07388551.2014.923986.
25. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Zaprometov MN. [Phenolic compounds and methods for their research]. In: Pavlinova OA, editor. *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biochemical methods in plant physiology]. Moscow: Nauka; 1971. p. 185–197. Russian.
27. Kurkin VA, Avdeeva OI, Avdeeva EV, Mizina PG. [Quantative determination of the amount of hydroxycinnamic acids in the aerial part of *Echinacea purpurea*]. *Rastitel'nye resursy*. 1998;34(2):81–85. Russian.
28. Volkov VA, Dorofeeva NA, Pakhomov PM. Kinetic method for studying the antiradical activity of medicinal plant extracts. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2009;43(6):27–31. Russian.
29. Filippenko TA, Belaya NI, Nikolaevskiy AN. [Phenolic compounds of plant extracts and their activity in reaction with diphenylpicrylhydrazyl]. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2004;38(8):34–36. Russian.
30. Zucker M. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiology*. 1968;43(3):365–374. DOI: 10.1104/pp.43.3.365.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
32. Yurin VM, Ditchenko TI, Filipava SN, Klyuchankova MV, Lohvina HO. Characterization of cell suspension culture as an object for industrial production of pharmacologically active substances. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2016;11(1):9–31. Russian.

33. Kurkin VA, Akushskaya AS, Avdeeva EV, Vel'myaikina EI, Daeva ED, Kadentsev VI. [*Echinacea purpurea* herb flavonoids]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2010;4:87–89. Russian.
34. Loc NH, Anh NHT, Khuyen LTM, An TNT. Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. *Journal of BioScience and Biotechnology* [Internet]. 2014 [cited 2020 March 1];3(1):1–6. Available from: [http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352484/jbb_2014-3\(1\)-pages_1-6.pdf/](http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/352484/jbb_2014-3(1)-pages_1-6.pdf/).
35. Correa-Higuera LJ, Sepúlveda-García EB, Ponce-Noyola T, Trejo-Espino JL, Jiménez-Aparicio AR, Luna-Palencia GR, et al. Glucoindole alkaloid accumulation induced by yeast extract in *Uncaria tomentosa* root cultures is involved in defense response. *Biotechnology Letters*. 2019;41(10):1233–1244. DOI: 10.1007/s10529-019-02714-1.
36. Yuan Y-J, Li C, Hu Z-D, Wu J-C, Zeng A-P. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. *Process Biochemistry*. 2002;38(2):193–198. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00071-7.
37. Putalun W, Luealon W, De-Eknamkul W, Tanaka H, Shoyama Y. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*. 2007;29(7):1143–1146. DOI: 10.1007/s10529-007-9368-8.
38. Xu X, Hu X, Neill SJ, Fang J, Cai W. Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant and Cell Physiology*. 2005;46(6):947–954. DOI: 10.1093/pcp/pci103.
39. Roat C, Ramawat KG. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnology Reports*. 2009;3(2):135–138. DOI: 10.1007/s11816-009-0082-y.
40. Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009;14(5):612. DOI: 10.1007/s12257-008-0316-9.
41. Cakir O, Ari S. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. *Journal of Environmental Biology*. 2009;30(1):51–55.
42. Bahabadi SE, Sharifi M, Behmanesh M, Safaie N, Murata J, Araki R, et al. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(5):487–491. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.12.006.
43. Gadzovska Simic S, Tusevski O, Maury S, Hano C, Delaunay A, Chabbert B, et al. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015;122(1):213–226. DOI: 10.1007/s11240-015-0762-y.
44. Kikowska M, Kędziora I, Krawczyk A, Thiem B. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. *Acta Biochimica Polonica*. 2015;62(2):197–200. DOI: 10.18388/abp.2014_880.
45. Yan Q, Shi M, Ng J, Wu JY. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*. 2006;170(4):853–858. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.12.004.
46. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2004;108(22):4916–4922. DOI: 10.1021/jp037247d.
47. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* [Internet]. 2019 [cited 2020 March 1];24:e00370. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2215017X19302383?token=67262F1C86CB4FEDE5B5D42FA891AC21D1B658CF599F9A2C4845FA40EA3101F18397AD015842CE2B786C7B-C7A4E20FE9>. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00370.

Статья поступила в редколлегию 19.03.2020.
Received by editorial board 19.03.2020.