

УДК 581.143

Получение и характеристика культур клеток живучки туркестанской *Ajuga turkestanica* (Rgl.) – продуцентов фитоэкдистероидов

© 2019 Р.П. ЗАКИРОВА¹, Г.И. СОБОЛЬКОВА², Т.Д. ХАРИТОНОВ², А.М. НИГМАТУЛЛАЕВ¹, Ш.Ш. САГДУЛЛАЕВ¹, Д.В. КОЧКИН^{2,3}, А.М. НОСОВ^{2,3,*}

¹Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз, Ташкент, 100170, Республика Узбекистан

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, Россия

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

*e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

После доработки 02.04.2019 г.

Принята к публикации 15. 05.2019 г.

Из дикорастущего растения получены каллусные культуры клеток *Ajuga turkestanica* и изучены процессы морфогенеза в этих культурах. В зависимости от гормонального состава сред в первые 6–8 циклов культивирования получали геммогенез или ризогенез; после 10–15 циклов выращивания культур способность к морфогенезу у культур была потеряна. Из хорошо растущих каллусов были инициированы суспензионные культуры клеток. В результате получено около ста линий каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica*, ряд из которых, характеризующийся интенсивным ростом, методом HPLC-MS проверили на присутствие фитоэкдистероидов. В большинстве из исследованных линий обнаружили присутствие 20-гидроксиэкдизона и туркестерона, при этом содержание 20-гидроксиэкдизона было в 30–50 раз выше, чем туркестерона (в наиболее продуктивных линиях – 2,0–2,5 мг/г и 0,04–0,05 мг/г сухой массы соответственно). Отмечено повышение содержания фитоэкдистероидов в клетках *in vitro* к концу цикла выращивания суспензионных культур клеток. В то же время во многих полученных линиях фитоэкдистероиды обнаружены не были. Для выяснение причин присутствия или отсутствия фитоэкдистероидов в культурах клеток *Ajuga turkestanica* необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: *Ajuga turkestanica*, дифференциация, геммогенез, культура клеток, регуляторы роста, ризогенез, фитоэкдистероиды, 20-гидроксиэкдизон, туркестерон.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-50-56

Особенность высших растений – это способность синтезировать вторичные метаболиты, широко используемые в фармакологии, косметологии и пищевой промышленности. Сбор растений в основном проводится из природных биоценозов, что может ставить под угрозу исчезновения используемый вид. Одним из эффективных способов решения проблемы сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений яв-

ляется разработка биотехнологических методов получения возобновляемого растительного сырья на основе промышленного выращивания культур клеток или органов растений *in vitro*. Для получения промышленных штаммов-продуцентов необходимо проведение комплекса фундаментальных исследований по изучению роста культивируемых клеток и биосинтеза ими вторичных соединений. Проведение подобных работ позволяет

Список сокращений: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, α -НУК – α -нафтилуксусная кислота, БАП – 6-бензиламино-пурин, ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором.

изучить физиологические процессы, характерные для данного вида или органа растения в условиях *in vitro*, исследовать чувствительность их по отношению к различным типам регуляторов роста, и оптимизировать образование целевых продуктов. [1].

Живучка туркестанская *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Briq. (Lamiaceae) является эндемиком Западного Тянь-Шаня и Гиссаро-Алая. Экдистероиды, синтезируемые этим растением обладают широким спектром биологической активности, в частности тонизирующей, адаптогенной, анаболической. [2–4]. К уникальным особенностям данного вида относится наличие туркестерона – 11-гидроксилированного экдистероида, обладающего анаболической активностью.

Ранее были проведены работы по получению и изучению особенностей культивирования каллусной ткани *Ajuga turkestanica*, инициированной из завязи интактного растений [5]. Целью настоящего исследования являлось получение культур клеток из листьев дикорастущего растения и изучение влияния регуляторов роста – синтетических аналогов фитогормонов – на морфогенетические, ростовые и биосинтетические процессы полученных культур клеток *Ajuga turkestanica*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал

Сбор исходного растений *Ajuga turkestanica* проводился в фазу цветения в 2014 г. близ поселка Байсун, в предгорьях Гиссарского хребта Республики Узбекистан. Каллусные культуры были получены по общепринятой методике из листовых эксплантов [6]. Культуры выращивали при температуре 26 °С в темноте на питательной среде Мурасиге–Скуга (MS) [7] с добавлением сахарозы 30 г/л, мезо-инозита 100 мг/л, тиамина 0,4 г/л и синтетических аналогов фитогормонов в различных комбинациях. Цикл культивирования (промежутков времени между пересадками) каллусных культур составлял 30 сут. С целью оптимизации питательной среды для культивирования каллусной ткани в первые циклы культивирования в качестве ауксинов были испытаны α -нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), в качестве цитокинина – 6-бензиламинопурина (БАП). Использовались следующие комбинации регуляторов роста в составах сред (мг/л): среда без регуляторов роста, НУК (0,1); НУК (1,0); НУК+БАП (1,0+0,2); 2,4Д (0,1); 2,4Д+БАП (1,0+0,2).

Ростовые и физиологические характеристики культур клеток определяли согласно общепринятым методикам [8]. Прирост каллусных культур клеток рассчитывали как отношение сухой массы клеток к моменту пересадки (30-е сутки культивирования) к массе трансплантата (100 ± 5 мг).

После 15-го цикла культивирования, из хорошо растущих каллусных линий были инициированы суспензионные культуры клеток, а также продолжены работы по оптимизации роста каллусных культур. Для этой серии работ наряду со средой MS была использована среда Гамборга (B5) [9], расширен набор синтетических аналогов фитогормонов (в качестве цитокинина использовали дополнительно кинетин) и диапазон их концентрации.

Эксперименты проводили в трех повторностях. Объем выборки $n \geq 25$. Полученные данные статистически обработаны в программе Microsoft Office Excel 2003.

Подготовка проб для анализа экдистероидов

Измельченную воздушно-сухую биомассу (36–40 мг, точная навеска) экстрагировали 3 раза по 1 мл воды в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ «Сапфир», Россия), после чего центрифугировали при 10 тыс. обор./мин в течение 10 мин (микроцентрифуга МЦФ БПУ, «Системы анализа», Россия) и отбирали супернатант. Объемные водные экстракты наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл воды, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 45 °С. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси этанол–вода (7,5:2,5 по объему) и фильтровали с помощью нейлонового фильтра с порами 0,2 мкм (Acrodisc, Pall Corporation, США).

ВЭЖХ-МС-анализ осуществляли на приборе Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенном масс-селективным детектором (6100, Agilent Technologies). Колонка – Poroshell 120 EC-C18 (100 × 3 мм, 2,7 мкм, Agilent). Температура колонки 43 °С, скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин, объем инъекции 0,4 мкл. В качестве подвижной фазы использовали 0,05% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). В процессе анализа состав подвижной фазы (Б) менялся по объему (0–13 мин – 15%, 13–13,5 мин – 15→95%, 13,5–15 мин – 95%, 15–15,5 мин. – 95→15%, 15,5–17 мин – 15%). Анализ осуществляли в режиме детектирования

отрицательных ионов (диапазон m/z 100–1300, фрагментор – 70). Параметры источника ионизации: температура квадруполя – 100 °С, температура газа-носителя (азот) – 250 °С, скорость подачи азота (распыляющий газ) 13 л/мин, давление азота 1811 торр, напряжение на капилляре – 3,5 кВ. Запись хроматограмм осуществляли в режиме выбранных ионов (m/z 525 (экдистерон) и 541 (туркестерон)), которые соответствовали $[M-H+HCOOH]^-$.

Для идентификации экдистероидов ВЭЖХ-МС-анализ проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Пробу в объеме 1 мкл наносили на колонку (50×2,1 мм, 1,7 мкм). Температура колонки составляла 40 °С, объемная скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся (доля растворителя Б по объему), а именно: 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15→30%, 5–15 мин – 30→38%, 15–15,5 мин – 48→45%, 15,5–23 мин – 45%, 23–23,5 мин – 45→95%). Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (m/z 100–1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120 °С, температура десольвации – 250 °С напряжение на капилляре – 3,0 кВ, напряжение на ко-

нусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 600 л/ч. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы MassLynx (Waters, США).

Количественное определение содержания индивидуальных экдистероидов

Анализ проводили с помощью ВЭЖХ-МС методом внешней калибровки против стандартных образцов экдистерона и туркестерона (предоставлены д.х.н. И.В. Заварзиным, ИОХ РАН). В описанных условиях проведения анализа относительное стандартное отклонение времени удерживания экдистероидов не превышало 2,5%. В рабочем диапазоне концентраций (5–100 мкг/мл для экдистерона и 0,5–100 мкг/мл для туркестерона) калибровочные кривые экдистероидов аппроксимировались прямыми линиями с коэффициентами детерминации $R^2 > 0,99$. Относительное стандартное отклонение площадей пиков экдистероидов не превышало 2,3%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления оптимального состава фитогормонов для роста культуры в первые циклы культивирования каллусные ткани высаживали на питательные среды содержащие 2,4-дихлорфеноксиуксусную (2,4-Д) и α -нафтилуксусную кислоту (НУК), а также 6-бензиламинопурин (БАП) в качестве цитокинина (табл.1). Было выявлено, что на средах с добавлением НУК 1 мг/л или в сочетании НУК 1 мг/л с БАП 0,2 мг/л в первые четыре цикла культивирования на поверхности

Таблица 1

Влияние синтетических аналогов фитогормонов на морфогенетические характеристики каллусной ткани *Ajuga turkestanica* в третьем цикле культивирования

The effect of synthetic analogues of phytohormones on the morphogenetic characteristics of *A. turkestanica* callus culture in the third cultivation cycle

Регулятор роста, мг/л		Морфогенез		Цвет	Внешний вид
ауксин	цитокинин	Стебли	Корни		
–	–	+	–	Желтый	Плотный
НУК, 0,1	–	+	–	Желтый	Плотный
НУК, 1,0	–	–	+	Желтый	Средней плотности
НУК, 1,0	БАП 0,2	–	+	Светло-коричневый	Средней плотности
2,4Д, 0,1	–	–	–	Светло-бурый	Рыхлый обводненный
2,4Д, 1,0	БАП 0,2	–	–	Зеленовато-бурый	Рыхлый обводненный

Примечание: Прочерк здесь и в табл 2 и 3 – отсутствие в среде соединения или морфогенез не наблюдался (Dash – no compound in the medium and morphogenesis was not observed)

калусов развивались многочисленные воздушные корни (рис. 1), тогда как на средах без регуляторов роста и на среде с НУК 0,1 мг/л в течение первых 7 циклов выращивания наблюдали стеблевой морфогенез (рис. 2).

Отмечено, что компактные каллусы давали начало рыхлым тканям при переносе их на среду с 2,4-Д в концентрации 0,1 и 1,0 мг/л. Этот регулятор роста подавлял морфогенетический потенциал независимо от его концентрации. Культура приобретала бурый цвет, становилась рыхлой и сильно обводненной. Поэтому при дальнейшем выращивании каллусных культур *A. turkestanica* 2,4-Д не использовали.

Образование побегов можно было индуцировать при переносе дедифференцированных каллусных культур, пассируемых больше года на среде, содержащую БАП в концентрации 0,2 мг/л. Культура приобретала глобулярный характер с хорошо выраженными очагами меристематической активности. На 7–10 сут после переноса каллусов на среду с БАП наблюдалось формирование почек, которые затем образовывали побеги. С повышением концентрации БАП в среде до 1 мг/л число побегов увеличивалось в среднем в 3 раза.

В процессе выращивания культур клеток было отмечено увеличение интенсивности роста каллусных культур клеток (табл. 2). Например, если в третьем цикле культивирования сырой вес каллусов, выращиваемых на безгормональной среде, к концу 4-й недели выращивания составлял в среднем 0,6 г, а сухой вес – 0,05 г, то в десятом цикле соответственно 1,7 г и 0,1 г. При этом в зависимости от состава сред происходило изменение обводненности клеток, о чем можно судить по изменениям индекса прироста клеток по сухой и сырой массе клеток.

После 15-го цикла культивирования, из хорошо растущих каллусных линий, имеющих рыхлую консистенцию, используя стандартные



Рис. 1. Корневой органогенез при выращивании каллусной культуры клеток *Ajuga turkestanica* на среде, содержащей НУК в концентрации 1,0 мг/л

Fig. 1. Root organogenesis in the callus culture of *A. turkestanica* (growing on the medium containing NAA at concentration of 1.0 mg / L)



Рис. 2. Стеблевой органогенез каллусной культуры клеток *Ajuga turkestanica* при культивировании на среде с БАП в концентрации 0,2 мг/л

Fig. 2. Stem organogenesis in the callus culture of *A. turkestanica* (growing on the medium containing BAP at concentration of 0.2 mg/L)

Таблица 2

Влияние синтетических аналогов фитогормонов на рост каллусных культур клеток *Ajuga turkestanica*

The effect of synthetic analogues of phytohormones on growth characteristics of the callus culture of *A. turkestanica*

Регуляторы роста, мг/л		Индекс прироста			
		3-й цикл		10-й цикл	
ауксин	цитокинин	по сырой массе	по сухой массе	по сырой массе	по сухой массе
–	–	6,1	5,3	17,2	10,4
НУК 0,1	–	7,8	7,6	18,7	10,0
НУК 1,0	–	16,0	8,5	19,3	10,2
НУК 1,0	БАП 0,2	17,4	4,9	18,9	9,8

методики, получили суспензионные культуры клеток. В результате было получено около ста каллусных и суспензионных линий культур клеток живучки туркестанской, семь из которых, характеризующиеся интенсивным ростом, проверили на присутствие фитостероидов методом ВЭЖХ-МС (рис. 3). Идентификацию соединений осуществляли на основании расшифровки масс-спектров и сопоставления хроматографического и масс-спектрометрического поведения обнаруженных соединений со стандартными образцами экидиостероидов (туркестерон и 20-гидроксиэкидизон) (рис. 4, рис. 5).

В двух суспензионных и двух каллусных линиях культур клеток *Ajuga turkestanica* обнаружили присутствие как 20-гидроксиэкидизона, так и туркестерона, при этом содержание 20-гидроксиэкидизона было в 40–50 раз выше, чем туркестерона (в наиболее продуктивных линиях – 2,2–2,5 мг/г и 0,04–0,05 мг/г сухой массы соответственно (табл. 3)).

Отмечено повышение содержания фитостероидов в биомассе суспензионных культур клеток к концу цикла культивирования. В то же время, в двух каллусных и одной суспензионной линии фитостероиды не были обнаружены.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о нестабильном поведении культур клеток в отношении биосинтеза фитостероидов. Однако даже в случае их образования, уровень накопления в клетках ниже, чем в листьях интактных растений, причем в разной степени для различных соединений: для 20-гидроксиэкидизона – в 2–3 раза, для туркестерона – в 20–30 раз.

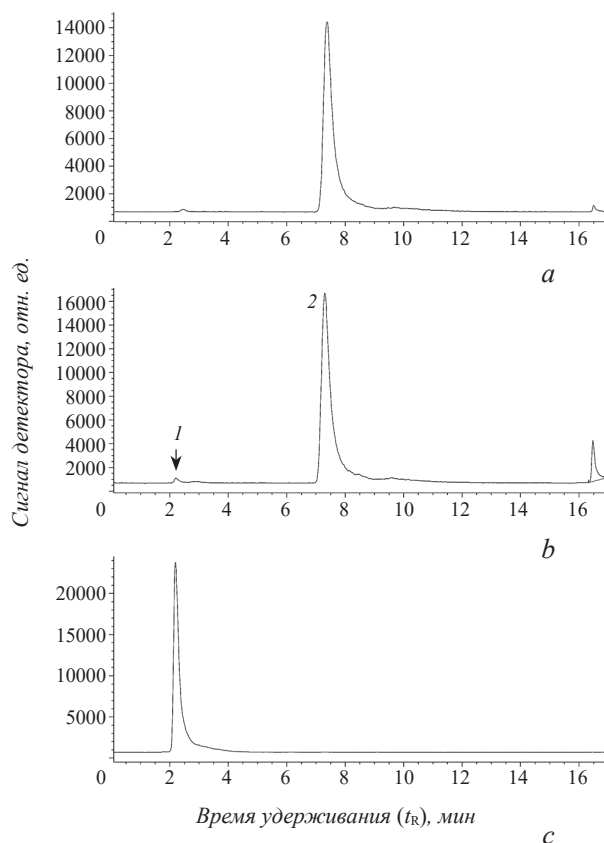


Рис. 3. ВЭЖХ-МС-хроматограмма растворов стандартов: *a* – 20-гидроксиэкидизона (0,1 мг/мл); *b* – экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *A. turkestanica* (линия № 4, см. табл. 3); *c* – туркестерона (0,1 мг/мл). 1 – туркестерон (t_R – 2,2 мин), 2 – 20-гидроксиэкидизон (t_R – 7,3 мин)

Fig. 3. HPLC-MS chromatograms of solutions of ecdysteroid standards. (a), 20-hydroxyecdysone, 0.1 mg/mL; (c), turkesterone 0.1 mg/mL; (b), the extract from biomass of *A. turkestanica* suspension-cell culture (strain No. 4, Table 3). Peak designation: 1 – turkesterone (t_R – 2.2 min), 2 – 20-hydroxyecdysone (t_R – 7.3 min)

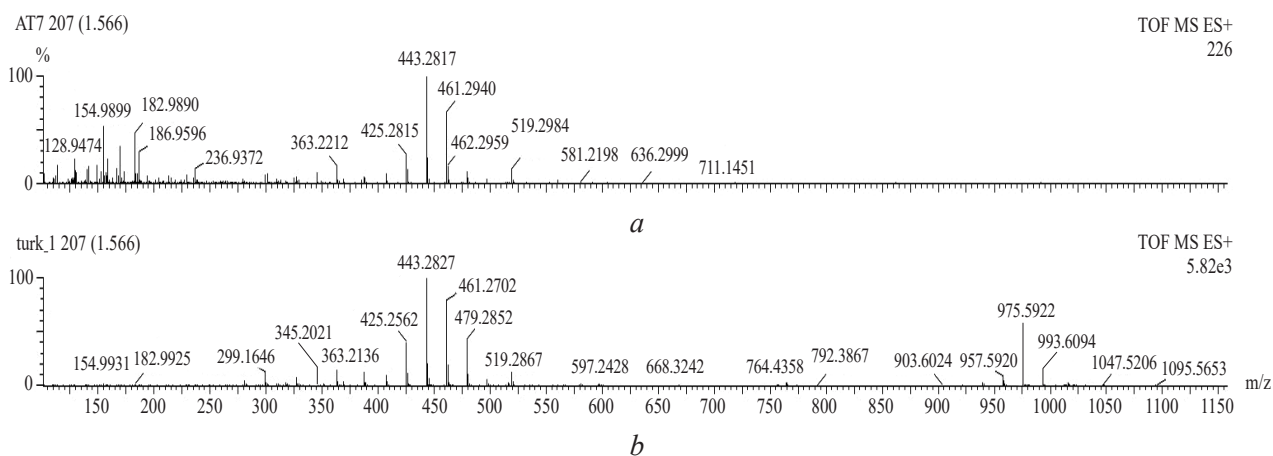


Рис. 4. Масс-спектры (положительные ионы) пика на хроматограмме экстракта из биомассы культуры клеток *A. turkestanica*, предположительно соответствующего туркестерону, (*a*) и стандартного образца туркестерона (*b*)

Fig. 4. MS-spectra (positive ions) of the peaks correspond to turkesterone in the chromatograms of the extract from biomass of *A. turkestanica* (*a*) and the solution of turkesterone standard (*b*)

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР КЛЕТОК ЖИВУЧКИ ТУРКЕСТАНСКОЙ

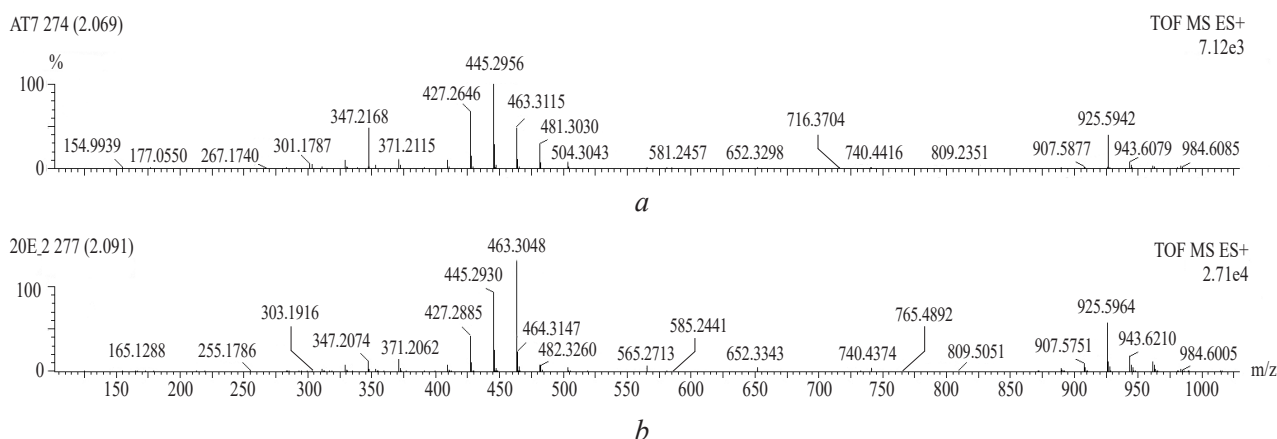


Рис. 5. Масс-спектры (положительные ионы) пика на хроматограмме экстракта из биомассы культуры клеток *A. turkestanica*, предположительно соответствующего 20-гидроксиэктидзону (а) и стандартного образца 20-гидроксиэктидзона (б)

Fig. 5. MS-spectra (positive ions) of the peaks correspond to 20-hydroxyecdysone in the chromatograms of the extract from biomass of *A. turkestanica* (a) and the solution of 20-hydroxyecdysone standard (b)

Таблица 3

Содержание эктистероидов (мг/г сух. биомассы) в биомассе каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* и в листьях интактного растения

Quantitative content of ecdysteroids in biomass of *Ajuga turkestanica* callus and suspension cell cultures and intact-plant leaves

Линия	Культура клеток	Культивирование, сут	Регуляторы роста, мг/л	20-гидроксиэктидзон	Туркестерон
№3	Каллус	21	НУК 0,1 + БАП 0,05	0,17	< 0,01
№4	Сусп	21	НУК 0,1 + БАП 0,05	0,64	< 0,01
		» »	27	НУК 0,1 + БАП 0,05	2,56
13б	Сусп	21	НУК 0,1 + Кин 0,1	0,58	< 0,01
		» »	34	НУК 0,1 + Кин 0,1	2,23
№38	Сусп	34	НУК 0,1 + БАП 0,05	< 0,1	–
№41	Каллус	34	НУК 0,1 + БАП 0,05	1,97	0,04
№70*	Каллус	33	НУК 0,1 + 2,4-Д 1,0 + БАП 0,05	–	–
№79	Каллус	33	НУК 0,1 + БАП 0,05	–	–
Листья интактного растения				4,90	1,65

Примечание: для этой серии работ использована среда MS. Кин – кинетин в качестве цитокинина, каллус – каллусная культура, сусп – суспензионная культура клеток.

*Использована среда Гамборга (B5).

Note: for this series of works the MS medium is used. Кин – kinetin as cytokinin, каллус – callus culture, сусп – suspension cell culture.

*Gamborg medium (B5) was used.

Таким образом, были изучены ростовые, морфогенетические и биосинтетические характеристики культур клеток *Ajuga turkestanica*. Выявлено, что добавление в состав среды в определенных соотношениях ауксинов и цитокининов обеспечивает регуляцию морфогенеза. Установлено, что некоторые из полученных каллусных и суспензионных культур сохраняют способность к образованию фитозэктистероидов (20-гидроксиэктидзона и туркестерона), однако в меньших количествах, чем

в листьях интактных растений. В ряде полученных культур клеток фитозэктистероиды не обнаружены. Для выяснения причин, обуславливающих синтез этих соединений в культурах клеток *in vitro* необходимы дополнительные исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-14-00126)

ЛИТЕРАТУРА

1. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*, 1999, 46(6), 837–844.
2. Кутепова Т.А., Сыров В.Н., Хушбактова З.А., Саатов З. Гипогликемическая активность суммы экидистероидов из *Ajuga turkestanica*. *Химико фармацевтический журнал*, 2001, 35(11), 24–25.
3. Сыров В.Н., Юлдашева Н.Х., Эгамова Ф.Р. и др. Оценка гипогликемического действия фитоэкидистероидов. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2012. 75(5) 28–31.
4. Сыров В.Н., Исламова Ж.И., Эгамова Ф.Р. и др. Стресс-протекторные свойства фитоэкидистероидов. *Экспериментальная и клиническая фармакология* 2014, 77(7), 35–38.
5. Закирова Р.П., Абдукадиров И.Т., Якубова М.Р. Возможность повышения содержания экидистероидов в каллусных и суспензионных культурах клеток *Ajuga turkestanica* за счет использования индуцированного морфогенеза. *Биотехнология*, 2012, (3), 44–47.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964, 272 с.
7. Murashige T., Skoog F.A., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(13), 473–497.
8. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. В кн. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М., БИОНОМ. 386–403.
9. Gambourg O.L., Elevelgh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and parleys. *Can. J. Biochem.*, 1968, 46, 417–421.

Obtaining and Characteristics of Plant Cell Cultures of *Ajuga turkestanica* (Rgl.) – Producing of Phytoecdysteroides

R.P. ZAKIROVA¹, G.I. SOBOLKOVA², T.D. KHARITONOV², A.M. NIGMATULLAEV¹, Sh.Sh. SAGDULLAEV¹, D.V. KOCHKIN^{2,3}, and A.M. NOSOV^{2,3,*}

¹*Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of Republic Uzbekistan, Tashkent 100170, Republic Uzbekistan*

²*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia*

³*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: al_nosov@mail.ru

Received December 07, 2018

Revised April 02, 2019

Accepted May 15, 2019

Abstract—Callus cultures of *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Briq. (Lamiaceae) were obtained from a wild plant, and the processes of morphogenesis in these cultures were studied. Depending on the hormonal composition of media, it is possible to obtain gemmogenesis or rhizogenesis in the first 6 to 8 growth cycles; after 10–15 growth cycles, the ability of morphogenesis was lost. Suspension cell cultures were initiated from some well-growing calluses. As a result, about one hundred calluses and suspension cell lines were obtained from the *Ajuga turkestanica* plant cells, a number of which were characterized by intensive growth and were analyzed by the HPLC-MS method for the presence of phytoecdysteroids. In most of the investigated lines, 20-hydroxyecdysone and turkesterone were found, the content of the first being 30–50 times higher than the second (in the most productive lines, 2.0–2.5 mg/g and 0.04–0.05 mg/g dry weight, respectively). An increase in the content of phytoecdysteroids in the *in vitro* cultivated cells by the end of the growing cycle was observed. However, phytoecdysteroids were not found in many of the obtained cell lines. Further research is needed to clarify the reasons for the presence or absence of phytoecdysteroids in *Ajuga turkestanica* plant cell cultures.

Key words: *Ajuga turkestanica*, plant cell culture, growth regulators, differentiation, gemmogenesis, rhizogenesis, phytoecdysteroids, 20-hydroxy ecdysone, turkesterone

Funding—The work was financially supported by the Russian Science Foundation (№ 16-14-00126).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-50-56