

## Математическое моделирование кривых роста штамма *Escherichia coli* — продуцента рекомбинантного белка $\beta$ -галактозидазы

Л. Н. Мойса, В. А. Чиялков

НПК «Диапроф Мед»  
Ул. Светлицкого, 35, Киев, 04123, Украина

---

*Методом кинетического анализа кривых роста на основе применения логистической функции Ферхюльста определены некоторые ростовые показатели, характеризующие физиологическую активность штамма *E. coli*, экспрессирующего рекомбинантный белок  $\beta$ -галактозидазу под контролем *C1857* гена. Рассчитаны критические точки роста, отражающие переломные моменты в развитии микробной популяции: переход возрастающей скорости роста в убывающую (точка перегиба кривой роста —  $T_e$ ), фаза максимального ускорения роста (точка  $T_1$ ) и фаза отрицательного ускорения (замедления) роста (точка  $T_2$ ). Данный метод позволяет прогнозировать оптимальные условия для экспрессии клонированного гена с учетом фазы роста бактериальной культуры.*

---

**Введение.** Рекомбинантные белки про- и эукариотного происхождения широко используются в современной биотехнологии для получения ценных иммунобиологических препаратов.

В разработанных на основе иммуноферментного анализа диагностических тест-системах производства НПК «Диапроф Мед» в качестве антигенов, сорбируемых на поверхности твердофазного носителя, применяют рекомбинантные полипептиды, представляющие собой продукты экспрессии клонированных фрагментов вирусных или бактериальных геномов в клетках *E. coli*. При этом целевой продукт может накапливаться как в растворимой форме, так и в виде нерастворимых телец включений, дальнейшее выделение и очистка которых осуществляются с помощью специальных физико-химических методов.

Хорошо известно, что у многих штаммов-продуцентов наблюдается значительное снижение скорости роста. Это объясняется тем, что большая часть материальных и энергетических ресурсов

центрального метаболизма клетки расходуется на производство совершенно ненужного, а иногда и токсичного для самих бактерий чужеродного белка. Поэтому в различных генно-инженерных конструкциях продуцентов используют регулируемые промоторы, позволяющие максимально зарепрессировать транскрипцию целевого гена до определенной стадии развития микроорганизмов, а затем проводится индукция биосинтеза заданного вещества [1]. Эффективность микробного синтеза в значительной мере зависит от того, насколько удачно подобраны условия для экспрессии, среди которых важную роль играет физиологическое состояние бактериальных клеток.

В специальной литературе хорошо изучены и описаны фазы роста микробных популяций. Для количественной характеристики физиологической активности используют такие кинетические показатели, как удельная скорость роста и отмирания бактериальных клеток, среднее время генерации и т. д. [2]. В условиях промышленного получения клеточной биомассы широкое распространение получил метод математического моделирования, по-

звоящий установить закономерности ростовых процессов и определить влияние факторов внешней среды [3, 4]. Такой подход представляет особый интерес при изучении динамики роста продуцентов в контролируемой индуцибельными промоторами экспрессирующей системе *E. coli* [5].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы на модели штамма *E. coli* ITG-1 — продуцента рекомбинантного белка  $\beta$ -галактозидазы — определить кинетические показатели роста, позволяющие оценить физиологический статус клеток в течение полного цикла развития бактериальной популяции в условиях производственного культивирования.

В задачи наших исследований входило: 1) подобрать адекватную математическую модель для описания кривых роста штамма *E. coli* ITG-1; 2) изучить влияние фазы роста и начальной концентрации клеток инокулята на динамику роста продуцента.

**Материалы и методы.** В качестве реципиента использовали штамм *E. coli* pop2136 [*F*<sup>supE44</sup> *hsdR17* *mcrA*<sup>+</sup> *mcrB*<sup>+</sup> *endA1* *thi-1* *aroB* *mal-c1857* $\lambda$  (*P<sub>R</sub>*)  $\lambda$ <sup>-</sup>], который был трансформирован рекомбинантной плазмидой *pEX*, содержащей фрагмент гена *lacZ*, кодирующего аминокислотную последовательность N-концевого участка  $\beta$ -галактозидазы.

Транскрипция целевого гена находится под контролем промотора фага  $\lambda$  (*P<sub>R</sub>*) и регулируется связыванием термолabileного *clts857* белка-репрессора с оператором [6].

Получение компетентных клеток *E. coli* pop2136 и трансформацию проводили по стандартной схеме [7]. Смесь клеток высевали на селективную агаризованную среду LB, содержащую ампициллин в конечной концентрации 50 мкг/мл. Резистентность к антибиотикам обеспечивается геном  $\beta$ -лактамазы (*bla*) в экспрессирующем векторе.

Плазмидосодержащие клоны-трансформанты использовали для приготовления посевного материала. Ночную культуру *E. coli* ITG-1 выращивали в колбах объемом 1 л, содержащих по 250 мл бульона LB с добавлением ампициллина до конечной концентрации 200 мкг/мл.

Культивирование проводили в течение 16—18 ч при температуре 32 °С в режиме интенсивного перемешивания (200 об/мин).

Для производственного накопления биомассы использовали 20-л ферментеры, содержащие по 9 л питательной среды следующего состава: минимальная солевая среда M9 с добавлением 10 г/л гидролизата казеина, 5 г/л дрожжевого экстракта,

10 г/л глюкозы и ампициллина в конечной концентрации 200 мкг/мл. Посевной материал вносили в ферментер и продолжали выращивать культуру при температуре 32 °С в условиях интенсивного перемешивания (300 об/мин) и аэрации (5 л/мин) при контролируемом значении pH (7,2—7,4). Через определенные промежутки времени отбирали пробы бактериальной суспензии и измеряли оптическую плотность культуры на спектрофотометре фирмы «Pharmacia» (Швеция) при длине волны 600 нм.

**Результаты и обсуждение.** Полученные в ходе опытов кривые зависимости оптической плотности клеток штамма *E. coli* ITG-1 от времени имели характерную для роста микроорганизмов *s*-образную (сигмоидную) форму (рис. 1). В литературе представлено большое количество динамических моделей, используемых для описания сигмоидных кривых. Среди них хорошо известна логистическая функция Ферхюльста, отличающаяся сравнительно небольшим количеством параметров с достаточно ясным математическим и биологическим смыслом. Существует несколько форм аналитического выражения этой функции [8—10]. Для аппроксимации эмпирических кривых роста нами была использована функция Ферхюльста следующего вида:

$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t}} + C, \quad (1)$$

где  $x$  — оптическая плотность бактерий, ОП<sub>600</sub>;  $t$  — время роста культуры, ч;  $A$  — верхняя асимптота функции (максимальное значение оптической плотности);  $C$  — нижний предел, с которого начинается рост функции (начальная оптическая плотность);  $\alpha$  и  $\beta$  — кинетические параметры, определяющие наклон, точку перегиба и форму логистической кривой.

Показатели  $\alpha$  и  $\beta$  вычисляли из линейной анаморфозы, получаемой логарифмированием функции Ферхюльста:

$$\lg \left( \frac{A - C}{x - C} - 1 \right) = \alpha + \beta \cdot t. \quad (2)$$

Из выражения (2) следует, что зависимость между переменными  $Y = \lg \left( \frac{A - C}{x - C} - 1 \right)$  и  $t$  описывается уравнением прямолинейной регрессии (рис. 2). Критерием для оценки линейности связи служит коэффициент детерминации  $R^2$  [11]. Для теоретической линии регрессии рассчитывали ошибку отклонения от регрессии ( $s_{yt}$ ) и ограничивали

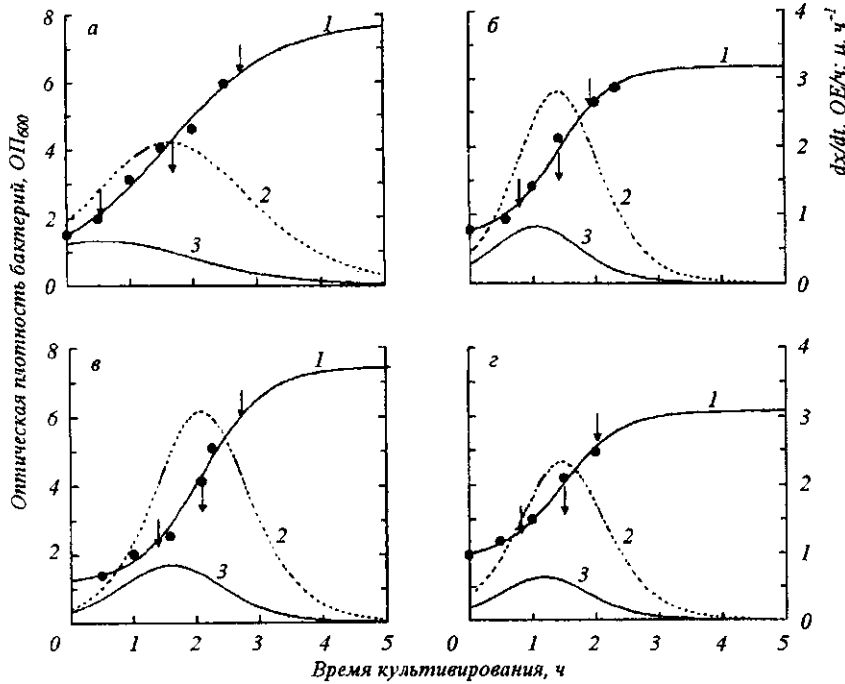


Рис. 1. Кривые роста штамма *Escherichia coli* ITG-1 в зависимости от фазы роста (а, б) и начальной концентрации клеток инокулята (в, г). Экспериментальные данные (точки) аппроксимированы по модели логистической функции Ферхюльста:  $x = \frac{A-C}{1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t}} + C$  (кривая 1), где  $C$  и  $A$  — нижняя и верхняя асимптоты функции;  $\alpha$  и  $\beta$  — показатели, определяющие поведение функции. Значения кинетических параметров для графиков: а —  $A = 7,80$ ,  $C = 0,60$ ,  $\alpha = 0,83868$ ,  $\beta = -0,51021$ ; б —  $A = 6,35$ ,  $C = 1,35$ ,  $\alpha = 1,373349$ ,  $\beta = -0,97652$ ; в —  $A = 7,45$ ,  $C = 1,15$ ,  $\alpha = 1,766999$ ,  $\beta = -0,850202$ ; г —  $A = 6,15$ ,  $C = 1,80$ ,  $\alpha = 1,37272$ ,  $\beta = -0,93243$ . По оси ординат (справа) — величины абсолютной ( $\frac{dx}{dt}$ , кривая 2) и удельной ( $\mu$ , кривая 3) скоростей роста. Стрелками указаны критические точки роста бактерий: перегиб логистической кривой (стрелка вниз под кривой 1), точка  $T_e(x_e; t_e)$ ; фаза максимального ускорения роста, точка  $T_1(x_1; t_1)$  и фаза отрицательного ускорения (замедления) роста, точка  $T_2(x_2; t_2)$  (стрелки слева и справа от точки перегиба над кривой 1)

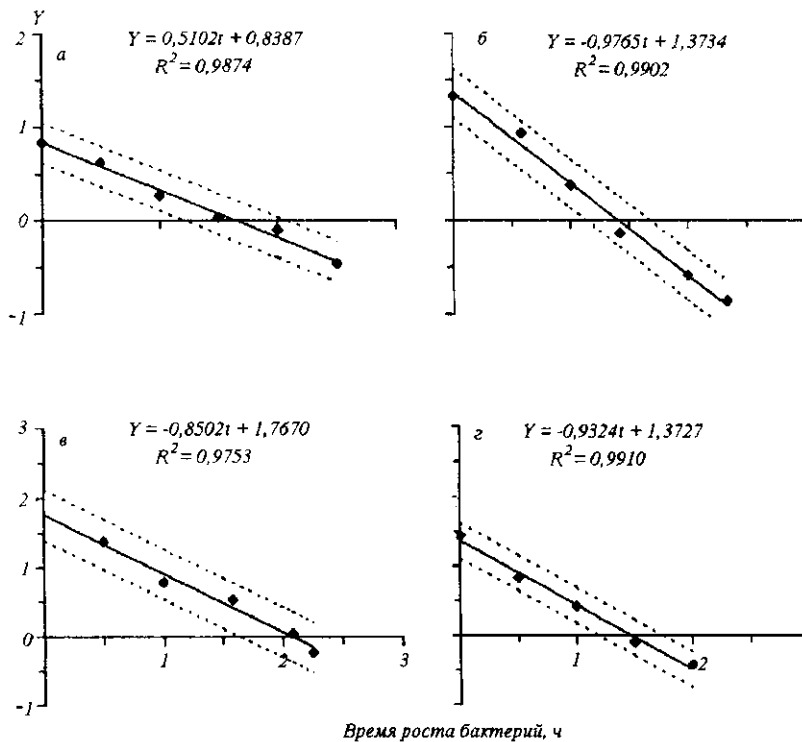


Рис. 2. Линейные анаморфозы логистической функции Ферхюльста для определения кинетических параметров  $\alpha$  и  $\beta$  кривых роста штамма *Escherichia coli* ITG-1, представленных на рис. 1. Точки на графике — экспериментальные данные; сплошные линии — теоретические линии регрессии  $Y = \lg \left( \frac{A-C}{x-C} - 1 \right)$  по  $t$ . Пунктирные линии ограничивают 95 %-ю доверительную зону регрессии.  $R^2$  — коэффициент детерминации. Адекватность аппроксимационной модели соответствует 1 %-му уровню значимости критерия Фишера ( $F$ -тест)

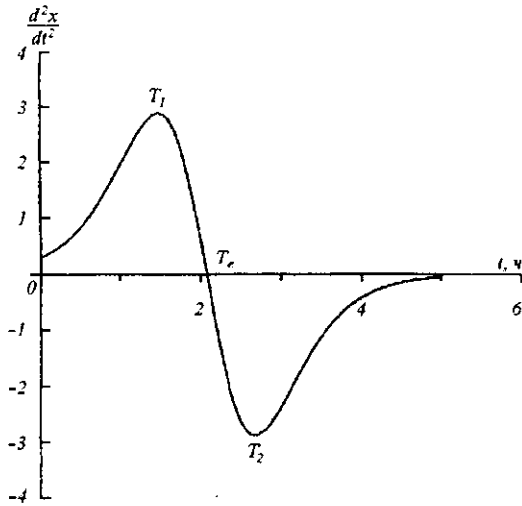


Рис. 3. Зависимость ускорения роста штамма *E. coli* ITG-1 от времени культивирования.  $T_1$ ,  $T_e$  и  $T_2$  — критические точки роста те же, что и на логистической кривой, рассчитанной по модели функции Ферхюльста (рис. 1, график в)

доверительный интервал для 5 %-го уровня значимости [12]. Степень адекватности аппроксимационной модели оценивали с помощью критерия Фишера [13].

Характерной особенностью кривых сигмоидного типа является наличие точки перегиба, отражающей момент перехода возрастающей скорости роста в убывающую. Для ее определения необходимо рассчитать первую и вторую производные функции (1).

Первую производную функции Ферхюльста, представляющую собой абсолютную скорость роста бактериальной популяции, находили по формуле

$$\frac{dx}{dt} = -(A - C)\beta \ln 10 \frac{10^{\alpha + \beta \cdot t}}{(1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t})^2}. \quad (3)$$

График функции  $\frac{dx}{dt}(t)$  имеет один экстремум (максимум), соответствующий максимальному значению абсолютной скорости роста бактерий  $\frac{dx}{dt}$  при

значении аргумента  $t = t_e$ , где  $t_e = -\frac{\alpha}{\beta} = \left| \frac{\alpha}{\beta} \right|$  (при условии  $t \geq 0$  показатели  $\alpha > 0$  и  $\beta < 0$ ).

Вторую производную функции (1), характеризующую ускорение роста культуры, определяли из выражения

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -(A - C) \frac{\beta^2 (\ln 10)^2 10^{\alpha + \beta \cdot t} (1 - 10^{\alpha + \beta \cdot t})}{(1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t})^3}. \quad (4)$$

График этой функции (рис. 3) имеет два экстремума — максимум (в точке  $T_1$ ) при значении

аргумента  $t = t_1$  и минимум (в точке  $T_2$ ) при значении аргумента  $t = t_2$ , а при  $t = t_e$  функция равна нулю, что является достаточным условием существования точки перегиба на графике основной функции [14].

Для определения значений аргументов  $t_1$  и  $t_2$ , соответствующих двум точкам перегиба на графике

функции первой производной  $\frac{dx}{dt}(t)$ , рассчитывали третью производную функции Ферхюльста и при выполнении условия  $\frac{d^3x}{dt^3} = 0$  получали следующие выражения:

$$t_1 = \frac{\lg(+\sqrt{3} + 2) - \alpha}{\beta}; \quad (5)$$

$$t_2 = \frac{\lg(-\sqrt{3} + 2) - \alpha}{\beta}.$$

Наиболее хорошо известным кинетическим параметром, характеризующим динамику роста микроорганизмов, является относительная (удельная)

скорость роста  $\mu = \frac{dx}{dt} \cdot x^{-1}$ . Эта величина отражает прирост биомассы  $dx$  в единицу времени  $dt$ , отнесенной к единице растущей биомассы  $x$  ( $ч^{-1}$ ).

В микробиологических исследованиях при описании динамики роста бактериальных популяций выделяют несколько стадий, соответствующих определенной физиологической активности клеток [8]. Вычисление координат критических точек  $T_1(x_1; t_1)$ ,  $T_2(x_2; t_2)$  и точки перегиба  $T_e(x_e; t_e)$  на логистической кривой позволяет четко разграничить во времени основные фазы роста штамма-продуцента. Так, подготовительный период, включающий лаг-фазу и фазу ускорения роста, наблюдается от момента внесения культуры инокулята в ферментер при  $t = 0$  и продолжается до момента времени  $t = t_1$ , где ускорение роста бактерий достигает своего максимального значения; почти линейный рост клеток (экспоненциальная фаза) длится в течение интервала времени от  $t = t_1$  до точки перегиба кривой при  $t = t_e$ ; затем наступает фаза замедления роста — промежуток времени от точки  $t = t_e$  до момента времени  $t = t_2$ , которому соответствует максимальное значение отрицательного ускорения (замедления) роста культуры.

Хорошо известно, что фаза роста и начальная концентрация клеток посевного материала могут оказывать существенное влияние как на продолжи-

Кинетические показатели физиологической активности штамма *E. coli* ITG-1, рассчитанные по аппроксимационной модели — логистической функции Ферхюльста

График на рис. 1	$x_0$	$\mu_0$	$t_1 - t_e$	$\mu_{\max}$	Фаза роста культуры					
					$T_1$ (максимальное ускорение роста)		$T_e$ (точка перегиба кривой — нулевое ускорение роста)		$T_2$ (отрицательное ускорение — замедление роста)	
					$dx/dt_1$	$\mu_1$	$dx/dt_e$	$\mu_e$	$dx/dt_2$	$\mu_2$
а	1,512	0,619	1,121	0,665	1,410	0,665	2,115	0,503	1,410	0,225
б	1,553	0,282	0,589	0,829	1,875	0,779	2,811	0,728	1,873	0,354
в	1,256	0,162	0,672	0,853	2,056	0,828	3,083	0,717	2,056	0,336
г	1,977	0,184	0,613	0,639	1,557	0,572	2,335	0,587	1,556	0,297

Примечание.  $T_1$ ,  $T_e$ ,  $T_2$  — критические точки на кривой роста штамма продуцента *E. coli* ITG-1;  $x$  — оптическая плотность культуры;  $x_0$  — оптическая плотность бактерий в момент времени  $t = 0$ ;  $t$  — время роста культуры, ч;  $t_1 - t_e$  — продолжительность экспоненциальной фазы роста;  $dx/dt$  — абсолютная скорость роста, ОЕ/ч;  $\mu_0$  — удельная скорость роста бактерий в момент времени  $t = 0$ ;  $\mu_{\max}$  — максимальная удельная скорость роста.

тельность цикла культивирования, так и на уровень микробного синтеза целевого белка [15, 16].

Из данных, представленных в таблице, видно, что в случае засева в ферментер инокулята, находящегося в экспоненциальной фазе развития (график а), наблюдалась хорошо выраженная тенденция к снижению кинетических показателей — аб-

солютной ( $\frac{dx}{dt}$ ) и удельной ( $\mu$ ) скоростей роста по сравнению с культурой в фазе замедления роста (график б). Однако при использовании физиологически более активных клеток практически в два раза увеличивалась продолжительность экспоненциальной фазы роста и на 1 о. е. повышался выход биомассы в точке максимального замедления роста ( $T_2$ ). В графической форме эти закономерности хорошо отражают профили абсолютной (кривая 2) и удельной (кривая 3) скоростей роста на рис. 1 (графики а и б).

Увеличение посевной дозы инокулята ( $x_0$ ) приводило к снижению показателей абсолютной и удельной скоростей роста штамма *E. coli* ITG-1 (таблица, графики в и г) и сокращению продолжительности экспоненциальной фазы ( $t_1 - t_e$ ) роста. При этом уменьшался и выход биомассы в критической точке  $T_2$  (рис. 1, графики в и г).

Определение кинетических показателей в экспоненциальной фазе роста представляет особый интерес для характеристики физиологического состояния бактериальных популяций. Как следует из графиков, представленных на рис. 1, наивысшее значение удельной скорости роста ( $\mu_{\max}$ ) наблюдается на участке экспоненциального роста, т. е. в

диапазоне критических точек роста от  $T_1$  до  $T_e$  (кривая 3). Величина абсолютной скорости роста (кривая 2) достигает своего максимального значения ( $\frac{dx}{dt_e}$ ) в точке перегиба логистической кривой.

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что наиболее высокий выход биомассы штамма *E. coli* ITG-1 получен в таких условиях культивирования, которые характеризовались наибольшей продолжительностью экспоненциальной фазы роста (1,121 ч) и наивысшим показателем величины абсолютной скорости роста (3,083 ОЕ/ч). В первом случае при засева в ферментер применяли культуру на стадии экспоненциального роста (рис. 1, а), а во втором — наиболее низкую начальную концентрацию клеток инокулята (рис. 1, в).

В заключение необходимо отметить, что сигмоидные кривые логистического типа широко используются для описания различных процессов роста как на уровне микро- [8, 17—19], так и макроорганизмов [10, 20, 21], что хорошо согласуется с результатами наших исследований. Универсальный характер модели логистической функции дает основание предположить, что использованный метод, позволяющий определить кинетические параметры физиологической активности бактериальных клеток *E. coli* в цикле периодического культивирования, может найти применение для оценки ростовых свойств и других штаммов-продуцентов, у которых транскрипция клонированного фрагмента ДНК находится под контролем индуцибельных промоторов. Такой подход в сопоставлении с данными о выходе биомассы или накоплении рекомбинантного белка

позволяет целенаправленно подбирать оптимальные условия для экспрессии клонированного гена с учетом фазы роста культуры.

Авторы выражают глубокую признательность В. М. Крикунцу за консультативную помощь при проведении математической обработки результатов исследований.

L. N. Moisa, V. A. Chiljakov

The modeling of a growth curve of the *Escherichia coli* strain producing recombinant  $\beta$ -galactosidase protein

#### Summary

A kinetics analysis method of growth curves based on the Verhulst logistic function has been used to determine some growth parameters describing physiological activity of an *E. coli* strain expressing a recombinant  $\beta$ -galactosidase protein controlled by C1857 gene. The several growth points critical for microbial population development such as transition of increasing growth speed to the decreasing one (the inflection point of the curve —  $T_c$ ), the maximal growth acceleration phase (the point  $T_1$ ), the negative growth acceleration (slowing) phase (the point  $T_2$ ) have been calculated. This approach provides the prediction of optimal conditions for the cloned gene expression in any age of the culture growth.

Л. М. Мойса, В. О. Чияжков

Математичне моделювання кривих росту штаму *Escherichia coli* — продуцента рекомбінантного білка  $\beta$ -галактозидази

#### Резюме

Методом кінетичного аналізу кривих росту із застосуванням логістичної функції Ферхюльста визначено деякі показники росту, що характеризують фізіологічну активність штаму *E. coli*, який експресує рекомбінантний білок  $\beta$ -галактозидази під контролем C1857 гена. Розраховано критичні точки росту, що відбивають переломні моменти у розвитку мікробної популяції: перехід зростаючої швидкості росту у спадаючу (точка перегину кривої росту —  $T_c$ ), фаза максимального прискорення росту (точка  $T_1$ ) і фаза від'ємного прискорення (уповільнення) росту (точка  $T_2$ ). Цей метод дозволяє прогнозувати оптимальні умови для експресії клонованого гена з урахуванням фази розвитку бактеріальної культури.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машко С. В., Скороходова А. Ю., Зыменков Д. В., Мищурина Т. А., Гаприков А. В., Беневоленский М. С., Киверо А. Д., Каташкина Ж. И., Дорошенко В. Г., Бирюкова И. В., Дебатов В. Г. Использование метаболической регуляции для оптимизации экспрессии генов в бактериальных клетках — новое направление биотехнологии XXI века // Биотехнология.—2002.—№ 4.—С. 3—14.
2. Печуркин Н. С. Популяционная микробиология / Под ред. И. И. Гительзон.—Новосибирск: Наука, 1978.—278 с.
3. Pinchuk R. J., Brown W. A., Hoghes S. M., Cooper D. G. Modeling of biological processes using self-cycling fermentation and genetic algorithms // Biotechnol. and Bioengin.—2000.—67, N 1.—P. 19—24.
4. Berkholtz R., Rohling D., Guthke R. Data and knowledge based experimental design for fermentation process optimiza-

- tion // Enzyme and Microb. Technol.—2000.—N 27.—P. 784—788.
5. Cubarsi R., Corchero J. L., Vila P., Villaverde A. Numerical techniques and mathematical modelling for C1857-controlled gene expression and cell growth in recombinant *E. coli* // IMA J. Math. Appl. Med. Biol.—1998.—15, N 3.—P. 257—278
6. Stanley K. K., Luzio J. P. Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins // The EMBO J.—1984.—3, N 6.—P. 1429—1434.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
8. Печуркин Н. С., Терсков И. А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях) / Под ред. И. И. Гительзон.—Новосибирск: Наука, 1975.—216 с.
9. Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve // Appl. and Environ. Microbiol.—1990.—56, N 6.—P. 1875—1881.
10. Плохинский Н. А. Биометрия.—М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970.—367 с.
11. Иберла К. Факторный анализ / Пер. с нем. В. М. Ивановой.—М.: Статистика, 1980.—398 с.
12. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований).—М.: Агропромиздат, 1985.—351 с.
13. Robinson J. A. Approaches and limits to modeling microbiological processes // Proc. 4th Int. symp. on Microb. Ecol. / Eds F. Megusar, M. Gantar.—Ljubljana: Slovene Soc. Microbiol., 1986.—P. 20—29.
14. Выгодский М. Я. Справочник по высшей математике.—М.: Гос. изд-во тех.-теор. лит-ры, 1957.—783 с.
15. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.—М.: Медицина, 1992.—192 с.
16. Лебедев Л. Р., Зернов Ю. П., Кривопалова Г. Н., Канишина А. В., Литовченко Л. Л., Пустошилова Н. М. Оптимизация процесса биосинтеза гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора при культивировании рекомбинантного штамма *Escherichia coli* SG 200-50/pGGf8 // Биотехнология.—1998.—№ 2.—С. 44—51.
17. Yano Y., Oguma T., Nagata H., Sasaki S. Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of *in vitro* bactericidal kinetics // Pharm. Sci.—1998.—87, N 10.—P. 1177—1183.
18. Rochet M. J., Flandrois J. P. Bacterial strain characterization using mathematical modelling of growth // Zentralbl. Bakteriolog.—1989.—271, N 1.—P. 2—10.
19. Peleg M. Modeling microbial population with the original and modified version of the continuous and discrete logistic equations // Crit. Rev. Food Sci. Nutr.—1977.—37, N 5.—P. 471—490.
20. Васильев Б. Р., Звонцова Н. А., Савинов И. П., Шмидт В. М. Математический анализ роста листьев // Бот. журн.—1973.—58, № 9.—С. 1294—1301.
21. Крикунец В. М., Мойса Л. М., Дубовенко Е. К., Малинская С. М., Чечельницька Л. М. Співвідношення кривих росту сої та динаміки ацетиленвільної активності кореневих бульбочок в онтогенезі рослини // Физиология и биохимия культур. растений.—1995.—27, № 1—2.—С. 11—19.

УДК 57.083.1:579.243:519.24  
Надійшла до редакції 15.09.03