

В. А. Кунах

ГЕНОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И НАКОПЛЕНИЕ ИНДОЛИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ, RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH.

Сделан анализ литературных данных и собственных исследований, выполненных в 1979—1993 гг. Главным результатом работы за этот период являются получение новых клеточных штаммов-продуцентов и разработка условий их выращивания, что повнесило накопление индолинового алкалоида аймалина до 6—8 %, а в отдельных случаях — до 20 %. Это почти в 100 раз выше в сравнении с 5—7-летними растениями, растущими в тропиках.

Введение. Биомасса культивируемых клеток растений с начала 80-х годов используется в качестве альтернативного источника экономически важных продуктов [1—19]. Однако ряд трудностей и нерешенных вопросов сдерживает широкомасштабное применение культивируемых клеток, обуславливает нерентабельность биотехнологических производств многих ценных видов растений. Если не касаться сугубо технологических и инженерно-конструкторских аспектов, суть их в следующем.

Неотселектированные дедифференцированные клетки накапливают, как правило, незначительное по сравнению с интактным растением количество экономически важных веществ специализированного обмена. Наиболее простым и часто применяемым подходом к повышению продуктивности является подбор физических и химических условий культивирования дедифференцированных клеток, в том числе условий иммобилизации клеток, обработки биотическими и абиотическими элиситорами, а также подбор условий индукции морфологической дифференциации и выращивания организованных клеточных структур. Эти работы привели во многих случаях к успеху. Однако они выполняются эмпирически и поэтому длительны и трудоемки (см., например, [10, 20—34]).

С использованием экспериментального мутагенеза стало возможным получение довольно продуктивных штаммов, накапливающих в ряде случаев весьма важные продукты, синтезируемые исходными растениями в незначительных количествах [1, 32, 35—37]. Эти исследования также эмпирические и не менее трудоемкие, положительных результатов описано мало.

Генетическая трансформация и другие генно-инженерные манипуляции позволили создать ряд перспективных культур. Особенно следует отметить трансформанты, выделенные с помощью агробактерии и ее плазмид, в частности, получение «бородатых корней», продуктивность которых оказалась достаточно высокой [1, 6, 29, 38—47]. Дальнейшее совершенствование методов получения генетических трансформантов и накопление результатов об особенностях их поведения и биосинтеза ими целевых продуктов, несомненно, расширят возможности их применения в биотехнологической промышленности.

Высокий уровень гетерогенности и изменчивости культивируемых клеток, особенно геномной изменчивости, приводящий в некоторых случаях к нестабильности продуктивности, может быть источником получения новых штаммов-продуцентов, что и было показано в ряде исследований, в том числе методом клонирования [6, 20, 31, 48—60]. Однако и

этот путь является весьма трудоемким в силу слабой изученности генетики продуктивности не только культивируемых клеток, но и подавляющего большинства интактных растений, перспективных для введения в культуру *in vitro*.

Знание особенностей и механизмов структурно-функциональной изменчивости генома культивируемых клеток, разработка генетических основ клеточной селекции позволят целенаправленно создавать стабильные штаммы-суперпродуценты. Использование таких штаммов повысит рентабельность и конкурентоспособность клеточных биотехнологий получения ценных продуктов растительного происхождения.

Исследования геномной изменчивости культивируемых клеток растений ведутся достаточно широко и на большом количестве объектов. Расширяются и углубляются работы по изучению их вторичного метаболизма. Однако эти исследования проводятся на разных объектах и практически независимо друг от друга. Поэтому полученные данные трудносравнимы и еще не позволяют сделать каких-либо значимых выводов о связи продуктивности и геномной изменчивости культивируемых клеток.

В настоящей работе приведен краткий анализ некоторых данных комплексных исследований культивируемых клеток раувольфии змеиной, выполненных, в основном, в отделе генетики клеточных популяций. Главный их результат — получение новых штаммов-продуцентов и разработка условий их выращивания, что повысило начальную продуктивность культивируемых клеток в десятки раз и позволило увеличить накопление индолинового алкалоида аймалина в сухой биомассе культивируемых клеток с 0,4 до 6—8 %, а в отдельных случаях — до 20 %.

Экспериментальный материал. Объекты исследования. Раувольфия змеиная *Rauwolfia serpentina* Benth.— тропическое растение. Она накапливает (преимущественно в корнях) широкий спектр алкалоидов, применяемых, в частности, для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Среди лекарственных препаратов, получаемых из раувольфии, широко известны резерпин, раунатин, депрессин и др. Особую ценность представляет индолиновый алкалоид аймалин — высокоэффективное антиаритмическое средство.

Аймалин или его производные (N_4 -пропилаймалин бромид, N_4 -пропилаймалин битартрат) являются наиболее эффективными, а с учетом меньших побочных действий — наиболее рекомендуемыми лечебными средствами среди известных препаратов для лечения желудочковых аритмий сердца (используются еще, как правило, этмоцизин и кардарон).

Дефицит тропического лекарственного сырья (корней 5—7-летних растений) может быть ликвидирован получением биомассы культивируемых клеток, накапливающей алкалоиды в качестве целевого продукта. Впервые культура тканей раувольфии змеиной была получена Р. Г. Бутенко в начале 60-х годов. В этой работе, а также в исследованиях, выполненных позже и на других видах раувольфии как в СССР, так и в других странах, было показано, что культивируемые клетки накапливают низкие количества алкалоидов, а содержание аймалина в сухой биомассе не превышает 0,1 % [61—67].

В нашем отделе исследования проводились со следующими объектами.

Интактные растения раувольфии змеиной, выращиваемые в теплице. Служили исходным материалом для получения культуры тканей, а также для биохимических и других исследований. Возраст растений от 1 до 6 лет.

Клеточная линия А. История получения штамма и результаты его анализа описаны в работах [37, 50, 68, 69]. К началу наших исследований линия А при выращивании на специально разработанной питательной среде с 5 %-й сахарозой — среде 5С [70] накапливала 1,8—1,9 % суммы алкалоидов, 0,7—0,8 % алкалоидов группы индолина и 0,4—0,5 % аймалина от массы сухой ткани.

Штамм К-20. Получен в нашем институте совместно с Ленинградским химико-фармацевтическим институтом (ЛХФИ) в результате ступенчатой селекции линии А на среде 6С с 6 %-й сахарозой, содержащей 5-метилтриптофан. Выращивается на агаризованной среде 6С [71] и накапливает 2,5—3,3 % суммы алкалоидов и 0,9—1,2 % аймалина от массы сухой ткани.

Штамм К-27. Получен в ЛХФИ совместно с нашим институтом в результате обработки клеточной линии А химическим мутагеном и дальнейшей селекции на продуктивность на среде 10С (с 10 %-й сахарозой). Выращивается на агаризованной среде 10С и накапливает 2,4—2,9 % суммы алкалоидов и 0,9—1,4 % аймалина.

Штамм А-10С. Клеточная линия А, адаптированная к росту на среде 10С. Ее продуктивность на 20—25 % выше, чем у клеточной линии А, выращиваемой на среде 5С.

Штамм Ф. Получен в ЛХФИ в результате обработки линии А химическим мутагеном и дальнейшей селекции по приросту биомассы на среде 10С. Выращивается на агаризованной среде 10С, накапливает в 2—3 раза больше биомассы, чем линия А, содержание суммы алкалоидов — 2,9—3,1 %, аймалина — 0,10—0,19 %.

Штамм RIII. Получен в нашем институте совместно с ЛХФИ в результате длительной селекции клеточной линии А в жидкой питательной среде РЖ. Растет в виде суспензии в среде РЖ [72] и накапливает 1,4—1,8 % суммы алкалоидов и 0,28—0,58 % аймалина.

Все изученные штаммы ауксин- и цитокининнезависимые.

Результаты и обсуждение. Число хромосом и анафазные aberrации. Популяции культивируемых клеток характеризуются, как правило, высоким уровнем кариотипической изменчивости. Не оказались исключением и культивируемые клетки раувольфии змеиной — анализируемые культуры были весьма гетерогенны по числу хромосом. При этом клетки разных уровней пloidности вступали в митоз преимущественно на разных стадиях роста культуры и в разное время суток. Рассмотрим это на примере клеточной линии А.

Изученному штамму свойствен циркадный ритм митотической активности с максимумами числа митозов в дневное время суток — в 14—18 ч (рис. 1, а). Клетки с разным числом хромосом вступали в митоз в значительной мере синхронно (рис. 1, б—г). В начале суточного подъема митотической активности делились диплоидные, а к концу подъема — тетра- и высокоплоидные клетки. Кривая числа триплоидных митозов имела зеркальный вид по отношению к кривой митотической активности. Более детально эти данные изложены в работе [69].

Анализ клеточной линии А в течение пассажа (фиксацию проводили через день в дневное время суток — в 16 ч) показал пять достоверных подъемов митотической активности (рис. 2, а). На протяжении первых 5 сут после пересадки делились преимущественно диплоидные клетки, они составляли около 70 % всех клеток в первом подъеме числа митозов. В дальнейшем число диплоидных делений резко снижалось и после 25—27 сут роста они не встречались совсем (рис. 2, б). Триплоидные клетки делились преимущественно во время второго и третьего подъемов митотической активности, их частота в эти сроки (на 11-е и 17-е сут) достигала 40 % и более (рис. 2, в). Тетраплоидные и высокоплоидные клетки приступали к делениям позже. В течение первых 5 дней их число колебалось в пределах 12—20 %, к 11-м сут оно составляло 50 %, начиная с 27-х сут — превышало 80 %, а к концу пассажа делились только тетраплоидные и высокоплоидные клетки (рис. 2, г). Более детальный анализ этих данных приведен в работе [69].

На рис. 3, а, представлено распределение клеток по числу наборов хромосом, полученное на основе усредненных за весь пассаж данных. Сравнение этой гистограммы с рис. 2 показывает, что результаты по числам хромосом, полученные на 7—13-е сут роста, примерно соответствуют распределению, регистрируемому на основе усредненных за весь пассаж данных. Проведенный контрольный анализ на 10-е сут

роста через 8 пассажей, т. е. год спустя при выращивании как на твердой, так и на жидкой питательной средах (рис. 3), показал практически полное соответствие гистограмм распределения по числу наборов хромосом данным, полученным ранее. Это свидетельствует о стабильности распределения клеток по числу хромосом в изученной линии А.

Уровень анафазных aberrаций хромосом в изученной популяции при поверхностном культивировании был низким, не превышающим

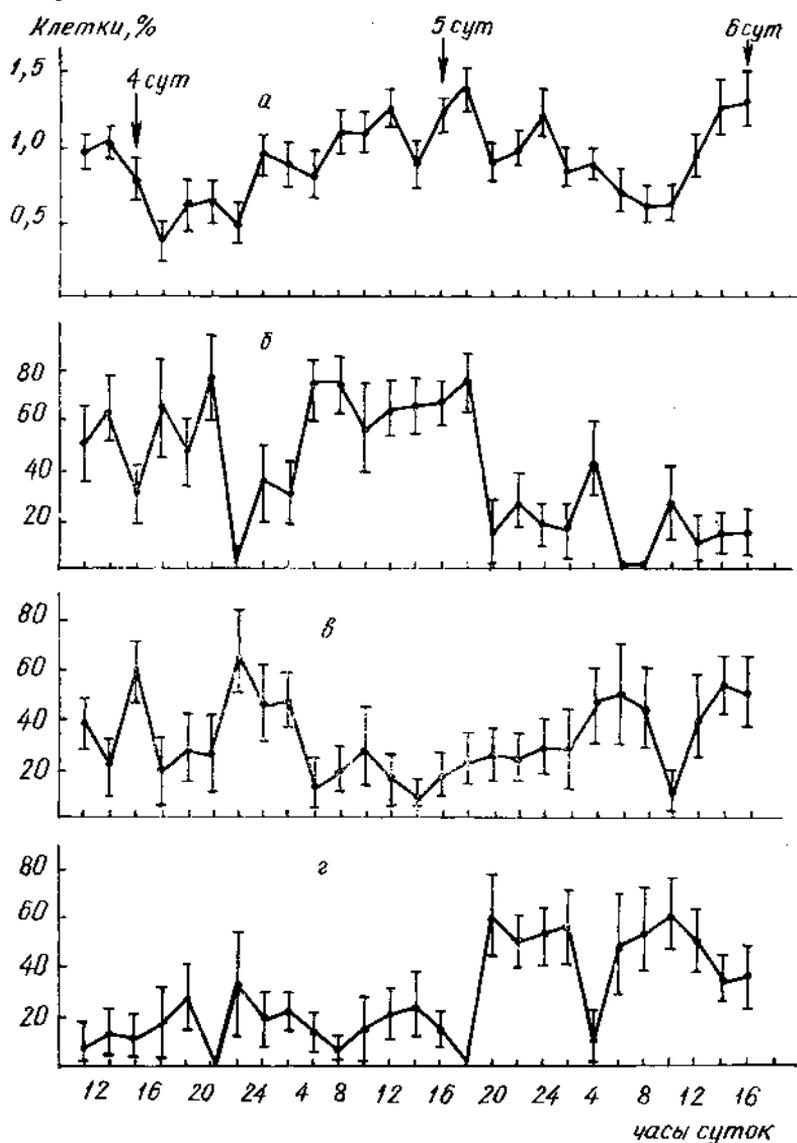


Рис. 1. Суточная динамика митотической активности (а), числа диплоидных (б), триплоидных (в), тетра- и высокоплоидных митозов (г) в линии А раувольфии змеиной

3 %. Перевод ткани в глубинную культуру привел к повышению их частоты до 10 %. При этом более половины анафаз с повреждениями хромосом составляли мосты без фрагментов (см. [68, 69]).

Таким образом, линия А — стабильная миксоплоидная клеточная популяция со сравнительно низким уровнем структурных мутаций хромосом, характеризующаяся разграничением во времени вступления в митоз клеток различных уровней плоидности. Ей характерна частичная синхронизация клеточных делений как в течение суток, так и в течение пассажа.

Уровень плоидности и продуктивность. Регуляция хромосомной изменчивости и продуктивности. Анализ клеточной линии А показал, что она состоит более чем на 80 % из полиплоидных клеток. Распределение по числу хромосом было стабильным в разных условиях выращивания (см. рис. 3).

Сравнение результатов цитогенетического анализа и данных по продуктивности линии А с литературными данными, полученными на других родственных штаммах (табл. 1), позволило высказать предположение о том, что повышенный выход алкалоидов в линии А обусловлен более высоким уровнем плоидности культивируемых клеток. В дальнейшем это предположение было доказано экспериментально.

Возможность получения клеточных линий заданного уровня плоидности появилась в результате опытов, показавших, что некоторые фитогормоны, азотистые основания и их аналоги, РНК и продукты ее модификации, а также аналоги некоторых аминокислот, в частности парафторфенилаланин (ПФФА), могут быть использованы как регуляторы плоидности популяций культивируемых клеток растений [75—80].

Вследствие длительного (не менее года) вы-

ращивания калусной ткани на питательных средах, содержащих указанные вещества, был получен от линии А ряд новых клеточных линий, различающихся между собой по уровню плоидности и стабильно сохраняющих эти различия при дальнейшем их выращивании на исходной питательной среде. Анализ этих линий показал зависимость их продуктивности от уровня плоидности культивируемых клеток (табл. 2). Более детально результаты данного исследования изложены в работе [81].

В дальнейших исследованиях были проведены селекция и анализ клеток линии А, устойчивых к более высоким концентрациям веществ, изменяющих плоидность. Кроме обладающих такими свойствами ПФФА и кинетина, использовали новые соединения — тиацил, характеризующийся ростстимулирующим и диплоидизирующим действием [80, 82], и аминокислотное производное 6-азаурацила — глиацил, описанный в работе [83].

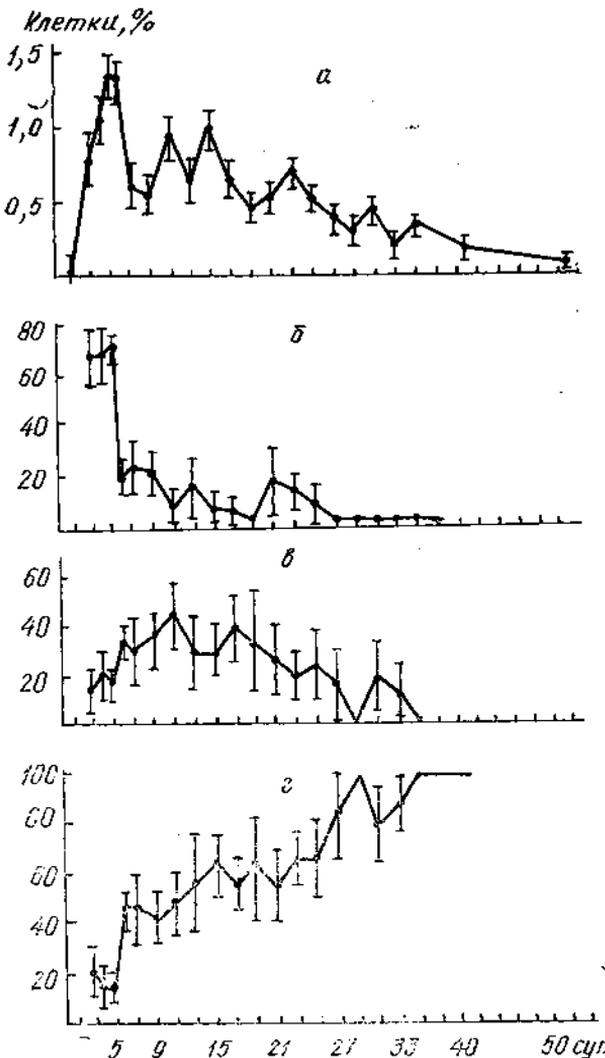


Рис. 2. Динамика митотической активности (а), числа диплоидных (б), триплоидных (в), тетра- и высокоплоидных митозов (г) в течение пассажа линии А культуры тканей раувольфии змеиной

ращивания калусной ткани на питательных средах, содержащих указанные вещества, был получен от линии А ряд новых клеточных линий, различающихся между собой по уровню плоидности и стабильно сохраняющих эти различия при дальнейшем их выращивании на исходной питательной среде. Анализ этих линий показал зависимость их продуктивности от уровня плоидности культивируемых клеток (табл. 2). Более детально результаты данного исследования изложены в работе [81].

В дальнейших исследованиях были проведены селекция и анализ клеток линии А, устойчивых к более высоким концентрациям веществ, изменяющих плоидность. Кроме обладающих такими свойствами ПФФА и кинетина, использовали новые соединения — тиацил, характеризующийся ростстимулирующим и диплоидизирующим действием [80, 82], и аминокислотное производное 6-азаурацила — глиацил, описанный в работе [83].

Селекцию осуществляли в течение двух лет, ступенчато повышая концентрацию. На первом этапе доза всех соединений была 20 мг/л. Конечная концентрация кинетина в среде была доведена до 100 мг/л, тиацила и глиацила — до 500 мг/л, ПФФА — до 400 мг/л. Более высокие дозы оказывали летальный эффект.

Анализ плоидности полученных таким образом вариантов линии А, а также содержания алкалоидов группы индолина был проведен после снятия селективного давления через 9 циклов выращивания устойчивых вариантов на исходной (контрольной) среде. Эти результаты

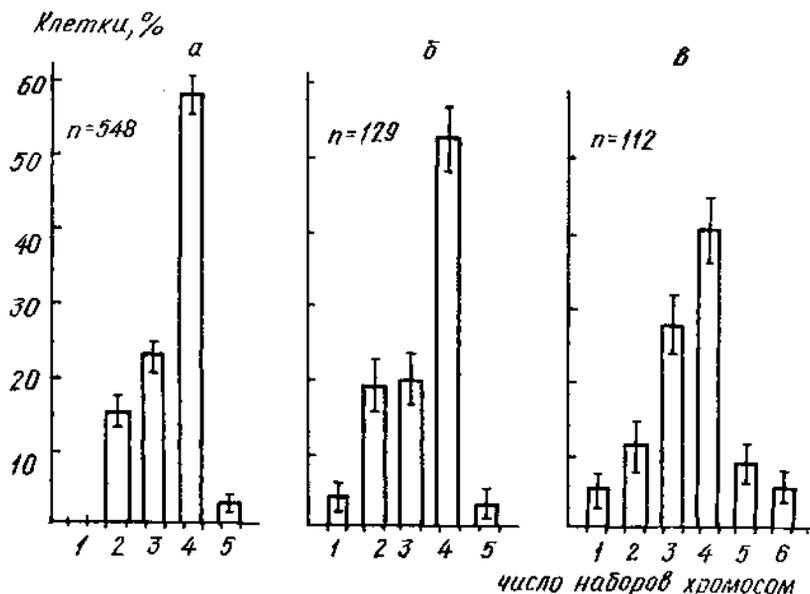


Рис. 3. Распределение клеток линии А раувольфии змеиной по числу наборов хромосом при выращивании на твердой среде (а), результаты такого же анализа, полученные год спустя при культивировании на твердой (б) и жидкой (в) питательных средах (здесь и на рис. 4 n — число изученных метафаз)

приведены на рис. 4 и табл. 3. Видно, что в данном эксперименте выявлен различный характер зависимости между уровнем плоидности делящихся клеток и содержанием алкалоидов в ткани к концу цикла выращивания. Так, вариант, устойчивый к глиацилу, оказался наиболее продуктивным по накоплению алкалоидов и при этом у него значительно возросла частота пентаплоидных клеток. Содержание алкалоидов в ткани устойчивого к кинетину варианта оставалось на уровне контроля, что совпало с отсутствием существенных изменений в частоте тетра- и пентаплоидных клеток. Значительное снижение продуктивности отмечено в варианте, устойчивом к ПФФА, у которого при этом резко уменьшилась доля тетраплоидных клеток. Однако вариант, устойчивый к тиацилу, не вписывается в ряд отмеченной тенденции, так как за сниже-

Таблица 1

Сравнительная характеристика различных штаммов и клеточных линий раувольфии змеиной; данные по содержанию алкалоидов приведены по [37]

Индекс штамма	Содержание алкалоидов, % от сухой биомассы		Плоидность культуры	Литературный источник
	Сумма алкалоидов	Алкалоиды группы индолина		
Рс (дикий исходный штамм)	0,76±0,03	0,19±0,02	Диплоидная	[73]
М1	0,90±0,03	0,29±0,03	Триплоидная	[74]
А	1,46±0,07	0,46±0,04	Тетраплоидная	[69]

нием у него частоты тетраплоидных клеток не последовало снижения продуктивности ткани. Содержание алкалоидов в этом варианте было несколько выше, чем в исходной линии А. Анализ связи изменений частоты триплоидных клеток и продуктивности тканей не выявил какой-либо закономерности. Частота триплоидных клеток повысилась в 2—3 раза у всех четырех вариантов, но продуктивность у них была разной.

В литературе имеются данные о том, что как индуцированные, так и встречающиеся в природе тетраплоидные формы раувольфии змеиной

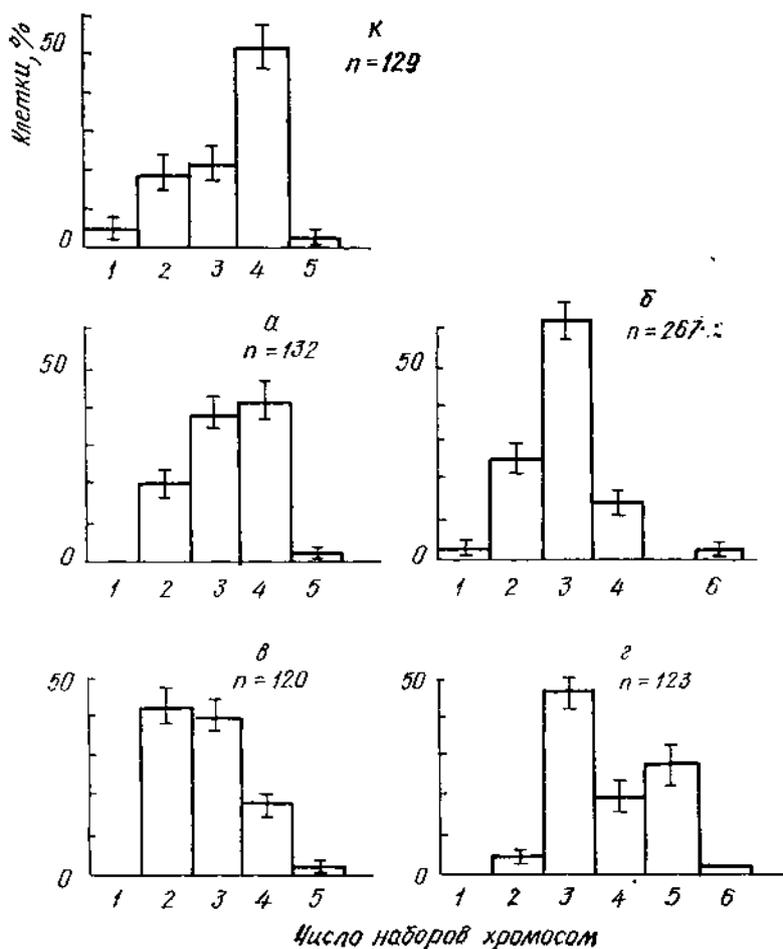


Рис. 4. Распределение клеток по числу наборов хромосом в каллусной ткани раувольфии змеиной линии А (К) и вариантов линии А, устойчивых к кинетину (а), парафторфенилаланину (б), тиацилу (в), глиацилу (г) и выращиваемых в течение 9 пассажей без селективного давления

накапливают больше алкалоидов, чем диплоиды [84, 85]. Более того, даже у диплоидных популяций раувольфии змеиной содержание резерпина коррелировало с количеством ДНК на клетку. Кстати, у гексаплоидного вида *R. canescens* корреляция оказалась отрицательной [86]. В исследованиях с культивируемыми клетками обнаружена и отрицательная корреляция между числом хромосом и продуктивностью [87]. Видимо, вопрос о связи уровня пloidности и продуктивности требует дополнительного изучения. Не исключено, что такая связь может быть разной не только у разных видов или у представителей разных популяций одного вида (см., например, [86]), но и, возможно, разной у разных клеточных штаммов одного вида и различаться при разных условиях выращивания штаммов. Тем не менее, из приведенных экспери-

ментальных данных видно, что у клеточной линии А раувольфии змеиной вызванные изменения плоидности клеточной популяции сопровождались изменением уровня биосинтеза индолиновых алкалоидов. Следовательно, регуляторы роста и некоторые другие подобные биологически активные вещества могут быть использованы не только для регуляции процессов вторичного метаболизма культивируемых клеток разных видов растений, разных по типу роста и степени дифференциации, в том числе трансформированных агробактерией [50, 88—97], но и для получения новых штаммов, повышенная продуктивность которых может быть обусловлена изменениями генетической структуры клеточных популяций, как это показано и другими исследователями [98]. Такие вещества представляют несомненный интерес еще и потому, что они, в отличие, например, от типичных мутагенов, вызывают, видимо, направленные изменения генетической структуры клеточных популяций.

Количество ядерной ДНК и биосинтез алкалоидов. Высокодифференцированные, специализированные и интенсивно функционирующие клетки и ткани интактных растений, в частности, запасные, секреторные, железистые и др. характеризуются, как правило, высоким уровнем плоидности. Следствием их полиплоидизации является повышение продуктивности клеточного метаболизма: увеличивается транскрипция, трансляция, секреторная активность и т. д. [99—101].

Результаты исследований, приведенные выше, свидетельствуют о том, что у раувольфии установлена определенная зависимость накопления индолиновых алкалоидов от уровня плоидности культивируемых клеток. Упомянутые исследования плоидности клеток относятся только к пролиферирующей части популяции, поскольку получены они подсчетом числа хромосом в метафазах. Однако процессы клеточного деления и вторичного метаболизма, как правило, разобщены во времени. Таким образом, истинное содержание ДНК в клетках, активно накапливающих алкалоиды, в приведенных выше опытах было неизвестно. Этот вопрос изучали, исследуя разные по продуктивности клеточные штаммы, а также интактное растение раувольфии змеиной (см. [102]).

Было установлено, что клетки верхушечной меристемы и молодых листьев интактного растения диплоидны: около 85 % изученных ядер содержали от 2 до 4 С ДНК.

Иную картину наблюдали в культивируемых клетках. Подсчет числа хромосом показал, что изученные штаммы являются миксоплоидными с преобладанием тетраплоидных клеток у линии А и триплоидных — у остальных штаммов. Значительная вариабельность установлена у

Таблица 2

Продуктивность некоторых новых клеточных линий раувольфии змеиной (данные приведены по [81] с дополнениями)

Индекс линии	Содержание алкалоидов группы индолина, % от сухой биомассы	Продуктивность, %	Плоидность клеток модального класса
А	0,50±0,03	100,0	Тетраплоидные
А-1	0,28±0,02	58,0	Триплоидные
А-2	0,20±0,01	35,4	Ди-, триплоидные
А-3	0,78±0,04	175,2	Пентаплоидные

Примечание. Продуктивность определяли как выход алкалоидов в г/л питательной среды за сутки роста.

Таблица 3

Содержание индолиновых алкалоидов у клеточных линий раувольфии змеиной, устойчивых к некоторым биологически активным веществам *

Конечная концентрация соединения, мг/л	Содержание алкалоидов, % от сухой биомассы
Контроль (линия А)	0,50±0,03
Кинетин, 100	0,53±0,04
ПФФА, 400	0,25±0,02
Тиацил, 500	0,61±0,05
Глиацил, 500	0,74±0,04

* Определение алкалоидов проводили в 9-м пассаже после снятия селективного давления.

них и по содержанию ДНК. Размах изменчивости по этому признаку был широким в течение всего пассажа, клетки распределялись в классы от 1 С до 27—30 С. Отдельные ядра штамма К-20 на 40-е сут роста содержали 56 С и более ДНК, максимальное количество ДНК (115 С) отмечено в некоторых ядрах штамма К-27 на 60-е сут роста.

Среднее содержание ДНК на ядро в течение пассажа линии А и более продуктивного штамма К-20 изменялось по-разному. У линии А содержание ДНК на ядро в течение первых 20 сут роста составляло около 10 С и существенно не менялось, а к концу пассажа несколько возросло (рис. 5, а). У штамма К-20 колебания в течение пассажа

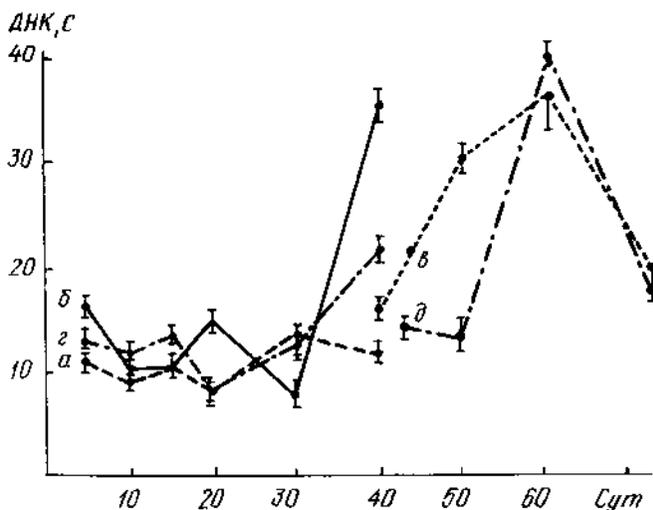


Рис. 5. Динамика среднего содержания ДНК на ядро в клетках линии А (а) и штаммов К-20 (б), К-27 (в), RIII (г) и А-10С (д)

были более существенными, и на 40-е сут количество ДНК на ядро увеличилось в пять раз — с $7,2 \pm 1,9$ до $35,1 \pm 1,8$ С (рис. 5, б). Среднее содержание ДНК в клетках суспензионной культуры RIII значительно возросло с 20-х до 40-х сут пассажа, хотя и не столь резко, как в штамме К-20 (рис. 5, г). Следует отметить подобие кривых изменчивости среднего содержания ДНК на ядро и содержания алкалоидов в культуре ткани (рис. 5, б). Другими словами, в данных опытах усиление синтеза алкалоидов сопровождалось увеличением среднего количества ДНК на ядро. Такое же явление наблюдали и у других высокопродуктивных штаммов К-27 и А-10С, где количество ДНК анализировали с момента начала активного синтеза алкалоидов и до завершения процессов их накопления (см. рис. 5, б).

Увеличение количества ДНК на ядро в изученных штаммах напоминает динамику числа высокоплоидных митозов в течение пассажа, описанную выше на примере линии А (см. рис. 2, г), но в данном случае этот процесс был сдвинут на более поздние сроки роста, он наблюдался на фоне почти полного отсутствия митозов и был более резко выражен.

Следует отметить несоответствие между данными подсчета числа хромосом и содержанием ДНК на ядро. В частности, максимальные по уровню плоидности клетки содержали 6—8, редко 10—15 и более наборов хромосом, модальный класс изученных штаммов составляли три- или тетраплоидные клетки. Количество же ДНК на ядро в среднем составляло более 10 С, значительная часть ядер содержала более 14 С, вплоть до 30 С; отмечены ядра, содержащие от 36 до 115 С ДНК. Для выявления причины этого несоответствия на примере линии А в максимуме митотической активности (на 5-е сут роста) было проанализировано количество ДНК отдельно в интерфазных и профазных ядрах

и проведен подсчет числа хромосом в метафазах на тех же препаратах, окрашенных по Фельгену.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что модальный класс среди делящихся клеток в это время составляли триплоидные клетки (рис. 7, а), в профазных ядрах среднее содержание ДНК равнялось $12,6 \pm 0,8 C$ (модальный класс составляли ядра, содержащие 12 C вместо ожидаемого 6 C), а в интерфазных ядрах — $7,1 \pm 0,6 C$

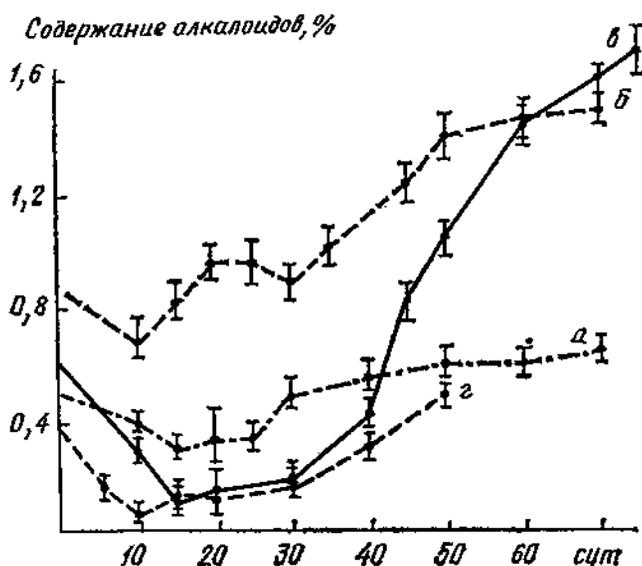


Рис. 6. Динамика накопления алкалоидов группы индолина в линии А (а) и штаммах К-20 (б), К-27 (в) и R111 (г)

(рис. 7, б, в). Отсюда следует, что в культивируемых клетках по сравнению с интактным растением количество ДНК на гаплоидный набор хромосом в 2 раза больше.

Таким образом, культивируемые клетки изученных штаммов раувольфии змеиной представляют собой миксоплоидные клеточные популяции с преобладанием полиплоидных клеток, штаммы характеризуются также широким размахом изменчивости по содержанию ядерной ДНК. При переходе к процессам вторичного метаболизма (накоплению алкалоидов) в клетках количество ДНК на ядро резко возрастает. У более продуктивных штаммов количество ДНК возрастает значительно сильнее. Следовательно, усиление синтеза алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной сопровождалось интенсивной предшествующей эндорепликацией ядерной ДНК.

Вариабельность последовательностей геномной ДНК. Одной из причин увеличения количества ДНК на геном в культивируемых клетках раувольфии может быть амплификация определенных последовательностей, что было показано в ряде экспериментов (см. [103, 104]).

Амплифицированные последовательности, обнаруженные у клеточной линии А (рис. 8), не исчезают при дальнейшем пассировании. Более того, они сохранились у ряда других штаммов, полученных из линии А как экспериментальным мутагенезом, так и длительной ступенчатой селекцией на специально разработанных питательных средах. Рестрикционный анализ геномов многих таких штаммов, отличающихся не только продуктивностью, но и уровнем пloidности и размахом карiotипической изменчивости, показал сходный набор амплифицированных фрагментов. Видимо, клетки, несущие амплифицированные последовательности, являются мажорным (модальным) классом, и присутствие таких последовательностей трудно объяснить одним лишь изменением пloidности, в том числе наличием анеуплоидных клеток.

Результаты дот-гибридизации, приведенные в табл. 4, показывают, что лишь небольшое количество (20—40 %) меченых повторов растения и каллусных тканей раувольфии гибридуется с суммарными ДНК как в «прямой» так и «обратной» реакциях гибридизации. В то же время сравнение ДНК двух клеточных штаммов обнаруживает высокую степень гомологии (70—90 %). Эти результаты свидетельствуют о значительных изменениях фракции повторяющихся последовательностей в

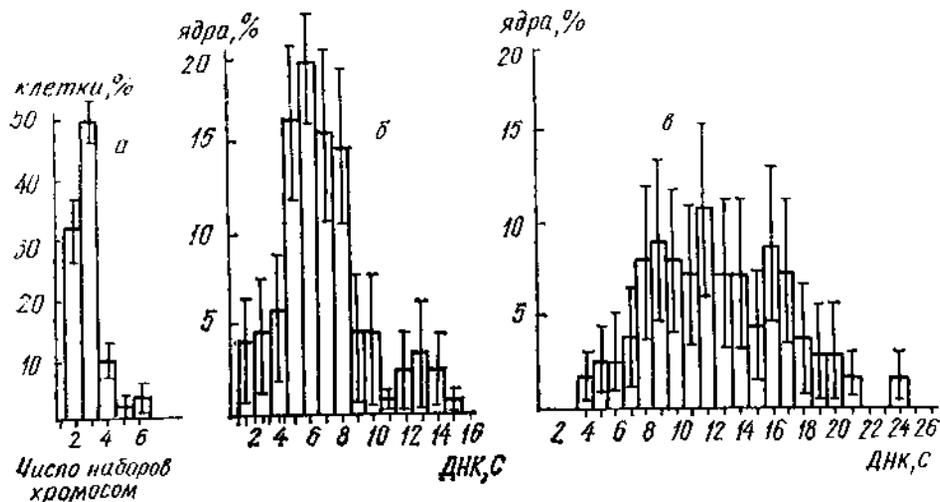


Рис. 1. Распределение клонок линии А на 5-е сут роста по числу наборов хромосом (а) и по содержанию ДНК на ядро в интерфазных (б) и профазных (в) клетках

геноме культивируемых клеток. Для сравнения: отличия между повторами интактного растения и каллусов раувольфии такие же, как между далекими видами одного семейства (например, между пшеницей и овсом у злаков) (см. [105]).

Различия в степени гибридизации, выявленные как в «прямой», так и «обратной» реакциях гибридизации, свидетельствуют о том, что культивирование растительных клеток может сопровождаться дивергенцией повторяющихся последовательностей. Однако, как и в случае культивируемых клеток скерды [106], масштабность обнаруженных отличий не может быть объяснена только лишь дивергенцией повторов.

Из рис. 9 видно, что ДНК интактного растения и двух клеточных штаммов раувольфии отличаются по скорости реассоциации, при этом ДНК каллусов реассоциирует быстрее в широком интервале значений параметра Cot . Это подтверждает увеличение общей доли повторяющихся последовательностей в геномах культивируемых клеток.

Данные, приведенные в табл. 5, свидетельствуют о том, что доля повторов (Cot до 100) в геномах культивируемых клеток возрастает с повышением уровня их пloidности. Следовательно, умножение генома в целом (полиплоидизация) сопровождалось в изученном случае

Таблица 4

Гомология повторяющихся последовательностей генома интактного растения и культивируемых клеток раувольфии змеиной. % (по [102])

Источник суммарной ДНК	Растение	Линия А	Штамм К-20	Источник суммарной ДНК	Растение	Линия А	Штамм К-20
Частые 3H -меченные повторы				Умеренные 3H -меченные повторы			
Растение	100	20±1	42±4	Растение	100	37±10	31±3
Линия А	19±3	100	85±1	Линия А	22±1	100	70±4
Штамм К-20	23±3	90±7	100	Штамм К-20	33±3	81±6	00

процессом избирательного умножения (эндоредупликации или амплификации) повторяющихся последовательностей.

Таким образом, анализ клеточной линии А и полученных на ее основе более продуктивных штаммов показал значительное переустройство их генома. Насколько существенно эти перестройки влияют на продуктивность, сказать трудно. Тем не менее, следует отметить, что

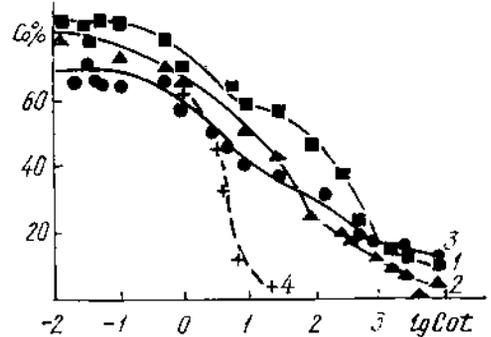
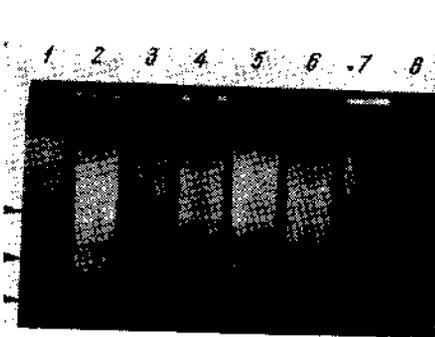


Рис. 8. *HindIII*-перевар суммарных ДНК интактного растения и различных штаммов культивируемых клеток раувольфии змеиной: 1 — интактное растение; 2 — линия А; 3 — штамм К-20; 4 — штамм К-27; 5 — штамм RIII; 6, 7 — клоны, полученные от штамма RIII; 8 — штамм Ф. Стрелками обозначены амплифицированные фрагменты

Рис. 9. Кинетика реассоциации ДНК интактного растения и культивируемых клеток раувольфии змеиной: 1 — растение; 2 — линия А; 3 — штамм К-20; 4 — *E. coli*

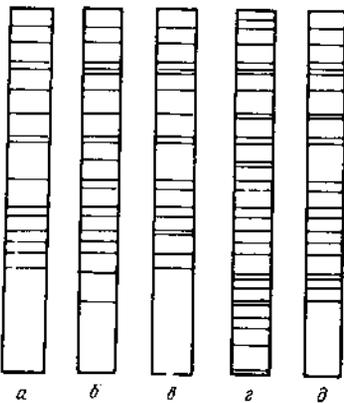


Рис. 10. Схема электрофоретических диаграмм растворимых белков в некоторых клеточных штаммах раувольфии змеиной: а — линия А; б — штамм А-10С; в — штамм К-20; г — штамм К-27; д — штамм Ф

Таблица 5

Доля повторяющихся последовательностей в геномах растения и культивируемых клеток раувольфии змеиной (по [103])

Геном	Модальный класс плоидности	Повторы. %	
		Cot до 0,01	Cot до 10
Интактное растение	2n	18±3	50±2
Штамм К-20	3n	34±5	68±1
Линия А	4n	20±1	73±1

такой же анализ, проведенный на примере «молодых» культур тканей раувольфии (от первичного каллуса до 1,5-летнего пассирования), выявил отсутствие столь значительных перестроек [104]. «Молодые» культуры алкалоиды накапливали в следовых количествах.

Изменчивость спектра белков. Изучение белкового полиморфизма, идентифицируемого электрофоретически, широко применяется в генетике, особенно в биохимической и популяционной генетике. Использование данных электрофореза белков в исследованиях культивируемых клеток затруднено некоторыми особенностями клеточных популяций. Главная проблема здесь не столько в отсутствии полового процесса или в высоком уровне изменчивости популяций, сколько в невозможности сегодня однозначно трактовать полученные результаты. Установленная изменчивость может быть следствием как мутаций, так и модификаций, а критериев биохимических отличий, возникших из-за структурных изменений генома, от результатов изменения регуляции его функционирования, сегодня нет. Тем не менее, электрофоретическое изучение белкового полиморфизма и, особенно, изменчивости спектра

ключевых ферментов биосинтеза целевого продукта может, по крайней мере, приблизить нас к пониманию причин и механизмов как низкой, так и высокой продуктивности клеточных штаммов.

Проведенные исследования показали, что спектр растворимых белков был разным у разных клеточных штаммов раувольфии [50, 107]. Этот признак, однако, варьировал: установлены значительные измене-

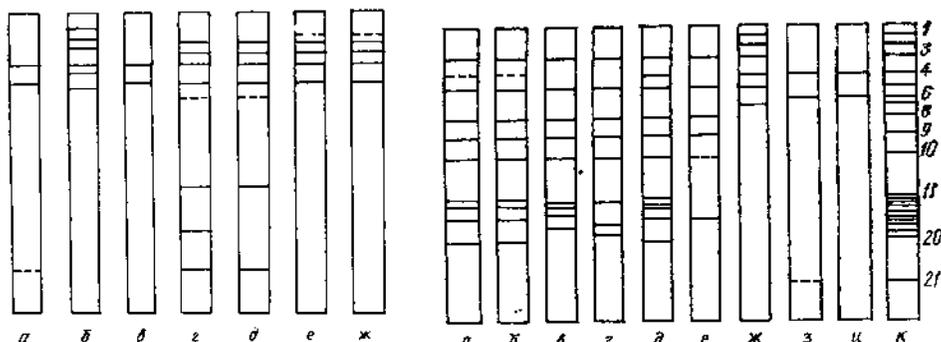


Рис. 11. Схема электрофореграмм множественных молекулярных форм эстераз четырехлетнего интактного растения и полученных от него каллусных тканей: а — лист; б — стебель; в — корень; г — первичный каллус; д, е, ж — 5, 13 и 16-й пассажи соответственно

Рис. 12. Схема электрофореграмм множественных молекулярных форм эстераз раувольфии змеиной: а — линия А; б — штамм А-10С; в — штамм К-20; г — штамм К-27; д — штамм RIII; е — штамм Ф; ж — стебель; з — лист; и — корень; к — схема обнаруженных изоформ эстераз

ния в спектре белков при смене условий выращивания клеточной линии А (рис. 10).

В дальнейших исследованиях, выполненных Е. Г. Алхимовой, изучали полиморфизм эстераз. При выборе данной группы ферментов исходили из того, что эстеразы являются ключевыми ферментами в биосинтезе некоторых алкалоидов, в частности, в биосинтезе аймалина у раувольфии змеиной [108—110].

Было проанализировано 4-летнее растение, первичный каллус и культивируемые ткани 5, 13 и 16-го пассажей, полученные от участка листа этого растения. В тканях корня растения обнаружены два компонента, находящихся в медленномигрирующей зоне полиакриламидного геля с R_m 0,29 и 0,36 (рис. 11). В листе, кроме тех же двух компонентов, слабо проявлялся еще один компонент в быстромигрирующей зоне. В стебле обнаружены 6 компонентов в медленномигрирующей зоне, один из которых совпадал с таковыми листа и корня (R_m 0,29). В первичном каллусе (полученном на участке листа) спектр эстераз значительно расширился при сохранении компонентов, свойственных листу. В дальнейшем число быстромигрирующих форм эстераз уменьшалось и в 13—16-м пассажах (в периоде сформированного штамма) обнаруживались лишь 4—5 компонентов в медленномигрирующей зоне геля, по подвижности соответствующих таковым первичного каллуса.

Следует отметить, что у полученных каллусных тканей накопление индольных алкалоидов, в том числе аймалина, было сравнительно низким, их содержание не превышало таковое у исходного растения.

Были изучены также длительно пассируемые штаммы, созданные на основе клеточной линии А. Это, кроме линии А, штаммы К-20, К-27, Ф, а также суспензионный штамм RIII. На рис. 12 представлены все обнаруженные у раувольфии змеиной формы изоэнзимов, пронумерованные в порядке возрастания подвижности.

Каждый из изученных штаммов характеризовался индивидуальным спектром эстераз. Этот спектр не изменялся в течение пассажа, не выявлено изменений и при длительном выращивании клеток на иных по составу питательных средах. Отличия между штаммами отмечались в

зоне быстромигрирующих изозимов, в некоторых случаях — в зоне медленномигрирующих эстераз. Обнаруживаемые только в культивируемых клетках среднемигрирующие эстеразы встречались во всех штаммах. Следовательно, спектр эстераз в сформированных штаммах раувольфии змеиной мало зависит от условий выращивания и может быть маркерным признаком штамма, а спектр растворимых белков подвержен значительным влияниям со стороны внешних условий.

Поиск возможной связи между уровнем биосинтеза аймалина и спектром эстераз показал, что только у наиболее продуктивных штаммов К-20 и К-27 обнаруживается эстераза № 12 и отсутствуют эстеразы № 20 и № 16. При более низком уровне синтеза аймалина в быстромигрирующей зоне геля эстеразы не выявлялись либо вовсе (интактное растение), либо большинство из них (см. рис. 11, 12). Однако полученные данные еще не позволяют сделать выводов о связи той или иной формы эстераз с продуктивностью штамма. Можно лишь заключить, что при введении клеток раувольфии в изолированную культуру происходит резкое расширение спектра эстераз за счет появления быстромигрирующих изозимов; спектр эстераз у разных штаммов отличается, он является стабильным и существенно не изменяется в разных условиях выращивания; изменение уровня биосинтеза аймалина сопровождается изменением спектра эстераз преимущественно в области быстромигрирующих изозимов. Спектр растворимых белков у разных штаммов также разный, но он подвержен значительным изменениям под влиянием условий выращивания.

Гетерогенность и наследуемость признака «содержание алкалоидов». Генетическая гетерогенность клеточных популяций, описанная выше, должна приводить и к неоднородности культуры по многим признакам, в том числе и по способности к накоплению вторичных продуктов биосинтеза. Изучение гетерогенности по содержанию алкалоидов группы индолина и наследуемости этого признака было проведено совместно с Вахтиным и др. [111] на примере клеточной линии А. Схема исследований была следующей.

Ткань выращивали с интервалом пересадок 30—40 сут. Во время пересадок из каждой колбы брали от 1 до 7 небольших, около 1 г, кусочков ткани и пересаживали на свежую среду. Остальную массу ткани использовали для анализа содержания индолиновых алкалоидов на 60-е сут роста. В следующем пассаже для пересадки, проводившейся аналогичным образом, преимущество отдавали субкультурам, в которых было обнаружено высокое содержание алкалоидов. Анализ вели в течение 10 пассажей в вариантах с пересадками 30 сут и 7 пассажей при пересадках через 40 сут. Наследуемость признака «содержание индолиновых алкалоидов» оценивали на основе корреляции «родители — потомки» по формуле [112]:

$$h^2 = \frac{\sigma_p^2 - \sigma_k^2}{\sigma_p^2},$$

где h^2 — наследуемость признака; σ_p^2 — дисперсия признака в популяции; σ_k^2 — средняя дисперсия признака в клонах.

У клеточной линии А обнаружен широкий размах изменчивости по содержанию алкалоидов группы индолина (почти четырехкратные различия крайних образцов по содержанию алкалоидов). Распределение одновершинно, кривые распределения примерно симметричны (рис. 13). Следовательно, признак «содержание индолиновых алкалоидов» фенотипически реализуется как типично количественный признак, контролируемый многими независимо варьирующими факторами среды.

Особенности фенотипической реализации признака не позволяют сделать какого-либо заключения о характере его наследственной регуляции, поскольку в случае количественных признаков одни и те же кривые распределения могут появляться как при наследственной однородности популяций по изучаемому признаку, так и при сильной на-

следственной гетерогенности по этому признаку. О присутствии наследственного компонента variability можно судить по влиянию отбора на величину популяционной средней и по наличию или отсутствию корреляции между «родителями» и «потомками».

Как видно из данных табл. 6, в обоих вариантах опыта наблюдалась тенденция к повышению содержания алкалоидов в ходе отбора. Коэффициенты корреляции содержания индолиновых алкалоидов в

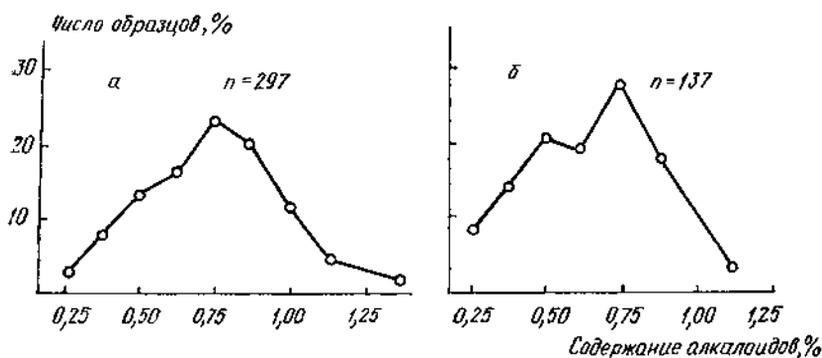


Рис. 13. Распределение субкультур линии А по содержанию индолиновых алкалоидов через 30 (а) и 40 (б) сут после пересадки (n — число изученных субкультур) (по [111] с уточнениями)

проведенных исследованиях у «родителей» и полученных от них «потомков» варьировали в широких пределах от $-0,48$ до $+0,89$, что, по-видимому, можно объяснить не только малым числом изученных образцов и высокой variability самого признака, но и известным антагонизмом процессов пролиферации и дифференциации клеток. Суммарные коэффициенты корреляции, численно равные коэффициентам наследуемости признака «содержание алкалоидов», составили $+0,45$ в случае пересадки ткани на 30-е сут и $+0,12$ — при пересадке на 40-е сут.

Изложенные данные показывают, что линия А не только фенотипически гетерогенна по содержанию алкалоидов группы индолина, но и наследственно гетерогенна по этому признаку. Об этом свидетельствуют как тенденция к повышению среднего содержания индолиновых алкалоидов в ходе проводившегося отбора, так и отличные от нуля величины полученных коэффициентов наследуемости.

Эффективность поддерживающего отбора. Опыт культивирования растительных тканей *in vitro* показал, что многие культуры в результате пересадок снижают или совсем теряют способность накапливать вещества специализированного обмена из-за возникновения малоактивных, но более жизнеспособных вариантов. Чтобы избежать резкого падения продуктивности и сохранить биосинтетическую активность штаммов, следует, видимо, применять поддерживающий отбор, интенсивность которого должна определяться изменчивостью селективируемых признаков.

Опираясь на положительные значения коэффициентов наследуемости признака «содержание индолиновых алкалоидов», были осуществлены опыты по применению поддерживающего отбора у клеточной линии А [113]. Поддерживающий отбор вели, пересаживая ткани в разные сроки: а) через 30 сут (в экспоненциальную фазу роста); б) через 40 сут — культура переходит в стационарную фазу роста; в) через 60 сут, когда культура уже закончила свой рост и наблюдаются лишь отдельные очаги деления полиплоидных клеток. Отбор проводили с использованием для пересадки культуры тканей, в которых содержание индолиновых алкалоидов не уступало средним показателям для данного пассажа.

В результате у линии А при применении поддерживающего отбора через 30 и 40 сут удалось значительно увеличить продуктивность культуры (рис. 14). При пересадках субкультур через каждые 60 сут поддерживающий отбор оказался неэффективным. По-видимому, в клеточных популяциях таких субкультур протекает естественный отбор в пользу низкодифференцированных вариантов с пониженным синтезом алкалоидов.

Применяя в течение ряда лет поддерживающий отбор, удалось повысить средний выход биомассы на 10 %, накопление индолиновых алкалоидов с $0,51 \pm 0,03$ % до $0,71 \pm 0,04$ %, содержание аймалина до $0,50 \pm 0,03$ %. Полученные в отдельных случаях более высокие показатели продуктивности в дальнейших пассажах уменьшались.

Соматическая изменчивость. Исходя из высокого уровня гетерогенности клеточных популяций раувольфии и учитывая положительное значение коэффициента наследуемости признака «содержание индолиновых алкалоидов», теоретически возможно получение разных по продуктивности клеточных клонов. Такие клоны были выделены и изучены [114].

Неоднократные попытки получения жизнеспособных пассируемых клонов от изолированных протопластов из каллусных и суспензионных культур, происходящих от линии А, не увенчались успехом. Клоны получали от отдельных клеток и клеточных агрегатов, используя для этого цитокинин- и ауксиннезависимый суспензионный штамм RIII.

Отфильтрованную клеточную суспензию, состоящую из отдельных клеток и небольших агрегатов, содержащих до 20—25 клеток, высевали в чашки Петри и выращивали в темноте при температуре 27 °С. Всего было испытано 16 вариантов питательных сред, наиболее удачной оказалась среда В5. Однако и на этой среде частота образования колоний была низкой, она не превышала 10^{-5} — 10^{-6} . Полученные на среде В5 колонии пересаживали на среду без фитогормонов 5С, разработанную для клеточной линии А [70]. Всего получено 32 клона, способных к пассируемому росту на этой среде. Их изучение проводили в течение более 5 лет. Клоны характеризовались выровненным ростом,

Таблица 6

Содержание алкалоидов группы индолина в субкультурах клеточной линии А раувольфии змеиной и коэффициенты корреляции «родители—потомки» (по [111] с уточнениями и дополнениями)

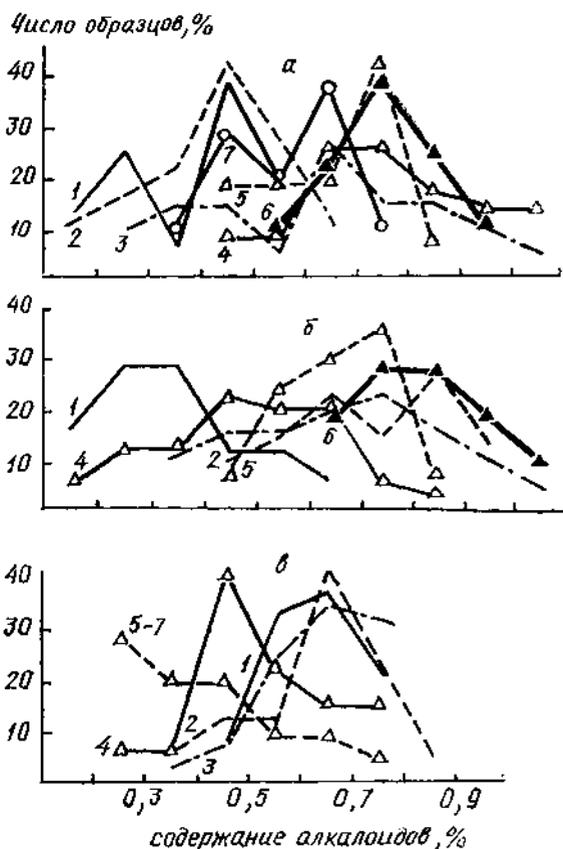
№ пассажа	Число «клонов»	Содержание алкалоидов в субкультурах, % от сухой массы			Коэффициент корреляции
		$M \pm m$	Lim	Cv	
Пассирование через 30 сут					
1	19	$0,72 \pm 0,036$	0,53—1,00	21,9	—
2	25	$0,43 \pm 0,017$	0,23—0,60	20,0	—0,362
3	32	$0,44 \pm 0,002$	0,15—0,64	2,8	0,459
4	21	$0,79 \pm 0,037$	0,39—1,07	21,6	0,016
5	24	$0,78 \pm 0,042$	0,47—1,17	26,3	0,125
6	47	$0,81 \pm 0,028$	0,42—1,18	22,5	0,886
7	40	$0,86 \pm 0,023$	0,54—1,19	16,9	0,570
8	23	$0,84 \pm 0,036$	0,30—1,03	20,2	0,330
9	18	$0,74 \pm 0,044$	0,30—0,96	25,2	—0,476
10	18	$0,88 \pm 0,037$	0,70—1,20	17,7	0,601
Пассирование через 40 сут					
1	18	$0,64 \pm 0,055$	0,31—0,86	36,5	—
2	22	$0,50 \pm 0,027$	0,35—0,65	25,4	0,494
3	22	$0,72 \pm 0,028$	0,47—1,02	17,9	0,113
4	37	$0,73 \pm 0,021$	0,36—0,89	17,1	—0,374
5	16	$0,60 \pm 0,035$	0,43—0,91	23,3	0,851
6	11	$0,68 \pm 0,032$	0,52—0,78	15,7	—0,211
7	11	$0,84 \pm 0,038$	0,65—1,05	15,1	—0,141

отличались друг от друга по типу и темпу роста, морфологии, способности к биосинтезу алкалоидов.

В табл. 7 приведены некоторые результаты изучения суммы алкалоидов и алкалоидов группы индолина в 10 разных клонах. Видно, что накопление алкалоидов в них было низким. Постоянный отбор по темпу роста и периодический (через 5—6 пассажей) поддерживающий отбор по признаку «содержание индолиновых алкалоидов» оказались малоэффективными. Селекция несколько повысила продуктивность лишь у трех из десяти детально изученных образцов. В результате клоны № 10 и № 29 приблизились по продуктивности до уровня исходного штамма, а у клона № 31 при такой же сумме алкалоидов накопление индолиновых алкалоидов к концу исследования вдвое превысило таковое у исходного штамма RIII.

Низкую продуктивность полученных клонов можно объяснить тем, что в исходной весьма гетерогенной клеточной популяции способностью к образованию колоний обладали, вероятно, клетки с низкой потенциальной способностью к биосинтезу алкалоидов. Доля

Рис. 14. Распределение культур по содержанию индолиновых алкалоидов при использовании поддерживающего отбора через 30 (а), 40 (б) и 60 (в) сут; 1—7—номера отбора (по [113] с уточнениями)



таких клеток в популяции, как уже отмечалось, небольшая, на уровне спонтанных мутаций (10^{-5} — 10^{-6}).

Видимое противоречие данных по клонированию и результатов изучения гетерогенности и наследуемости по содержанию алкалоидов можно объяснить тем, что в последнем случае использовали пусть небольшие, но участки каллусных тканей массой до 1 г, состоящие из большого числа клеток. Такого количества клеток оказалось, видимо, достаточно для сохранения особенностей популяции, механизмов ее генетического и физиологического гомеостаза. Антагонизм между процессами пролиферации и вторичного метаболизма в этом случае был менее выражен, чем при получении клонов от отдельных клеток, хотя и влиял на значение коэффициента корреляции содержания индолиновых алкалоидов у «родителей» и «потомков», увеличивая размах его варьирования. Клоны же, полученные от отдельных клеток, лишь после длительного отбора могут восстановить исходный уровень биосинтеза алкалоидов и в редких случаях превысить его.

Такая трактовка полученных данных противоречит мнению французских исследователей, проводивших подобные работы на культивируемых клетках *Choisya ternata*. Эти авторы считают, что для селекции линий с повышенным содержанием алкалоидов более эффективен метод клонирования протопластов, чем метод клонирования клеточных агре-

готов, поскольку агрегатные клоны характеризуются нестабильностью накопления алкалоидов [115]. И все же, опираясь на собственный опыт, мы считаем возможным предположить, что структурной единицей изученной нами культуры как биологической системы, сохраняющей ее способность к биосинтезу алкалоидов, является не отдельная клетка, а многоклеточные агрегаты с живой массой не менее 0,1 г.

Таким образом, клонирование клеточной линии А и ее производных для получения более продуктивных вариантов в изложенных экспериментах оказалось весьма трудоемким. Главная причина этого в довольно сложной и все еще мало изученной организации популяции культивируемых клеток как биологической системы, процессы восстановления ряда особенностей которой как системы после вычленения ее компонентов — отдельных клеток достаточно длительны.

Устойчивость к 5-метилтриптофану и продуктивность. Резистентность к токсичным аналогам аминокислот в ряде случаев сопровождается суперсинтезом основной аминокислоты [116]. Селекция клеток, устойчивых к 5-метилтриптофану (5-МТ), может привести к повышенному синтезу триптофана, который является исходным в биосинтезе индольных и индолиновых алкалоидов [117—119]. Однако повышенный синтез триптофана у клеточных линий, устойчивых к 5-МТ, далеко не всегда сопровождается интенсификацией накопления алкалоидов, как это показано, например, для *Catharanthus roseus* [117]. Описано даже снижение синтеза у таких клеток, например, аймалицина у того же *C. roseus* [118]. Тем не менее, учитывая, что в клеточных штаммах раувольфии змеиной конкуренция за общий субстрат процессов первичного метаболизма и накопления алкалоидов незначительна [107], у таких клеток в ряде случаев можно ожидать повышенного накопления индолиновых алкалоидов. Исходя из этого была проведена длительная ступенчатая селекция клеток раувольфии змеиной, где исходным материалом служила клеточная линия А [120].

Культивируемые клетки раувольфии змеиной оказались весьма чувствительными к 5-МТ, добавление которого в питательную среду в количестве 50 мг/л в течение 2—3 недель полностью подавляло их рост. Однако при ступенчатом повышении концентрации 5-МТ в питательной среде с 10 мг/л до 100 мг/л из популяции клеток линии А были выделены клетки (вероятно, спонтанные мутанты), способные к росту в присутствии высоких концентраций антимаболита. Селекцию вели по следующей схеме.

Кусочки исходной ткани 45-дневного возраста массой около 0,3 г перенесли на среду, содержащую 10 мг/л 5-МТ. Через 45 сут роста была отобрана пробирка с наилучшим приростом биомассы, и ткань рассажена на среду, содержащую 30 мг/л 5-МТ. (Во всех дальнейших пас-

Таблица 7

Содержание алкалоидов в клонах, полученных от отдельных клеток штамма RIII суспензионной культуры раувольфии змеиной*

№ клона	Сумма алкалоидов			Индолиновые алкалоиды		
	6-д**	21-й	46-й	6-й	21-й	46-й
4	1,04	1,23	0,80	0,16	0,26	0,21
10	1,17	1,17	0,90	0,09	0,08	0,39
14	1,25	0,95	1,21	0,20	0,33	0,22
16	—	—	0,90	0,19	0,07	0,04
20	1,27	1,30	0,90	0,07	0,09	0,10
27	1,03	1,01	—	0,05	0,08	0,05
28	1,10	1,13	1,04	0,14	0,03	0,04
29	1,08	1,02	0,80	0,07	0,35	0,30
30	1,01	0,95	0,93	0,38	0,24	0,38
31	1,35	1,40	1,34	0,10	0,40	0,71

* Содержание суммы алкалоидов и индолиновых алкалоидов в исходном штамме RIII соответственно 1,40 и 0,42 %; ** номер пассажа.

сажах для пересадки использовали ткань только из одной пробирки с наилучшим приростом биомассы.) В следующем пассаже концентрацию 5-МТ в питательной среде увеличили до 50 мг/л. В дальнейшем в течение шести пассажей ткань культивировали на среде, содержащей 100 мг/л 5-МТ. После этого (спустя девять пассажей на среде с 5-МТ) ткань выращивали на контрольной среде без антимаболита. Спустя три пассажа выращивания на контрольной среде в отселектированных на устойчивость к 5-МТ тканях было определено содержание алкалоидов. Оказалось, что сумма алкалоидов в них равнялась $2,14 \pm 0,12 \%$, а содержание индолиновых алкалоидов — $0,68 \pm 0,04$, что было выше, чем в линии А ($1,95 \pm 0,13 \%$ и $0,59 \pm 0,07 \%$ соответствующих алкалоидов). В дальнейшем среду 5 С заменили средой 6 С (содержащей 6 % сахарозы), а для пересадки опытных тканей использовали колбы с наибольшей продуктивностью. Для этого перед очередной пересадкой определяли содержание алкалоидов в колбах с лучшим ростом, пересаживая лишь ткань с наибольшим содержанием алкалоидов. В результате такой селекции по признакам «темпа роста» и «содержание индолиновых алкалоидов», начиная с 6-го пассажа, содержание индолиновых алкалоидов в полученных тканях превышало 1 %, а после 10 циклов селекции было не ниже 1,2 %. Всесторонний цитологический, биохимический и генетический анализ показал существенные отличия полученной культуры от исходной линии А и этой ткани был дан статус штамма с названием К-20.

Проведенные в дальнейшем еще три цикла отбора на среде с 5-МТ по описанной выше схеме, где исходным материалом служил штамм К-20, позволили получить новую клеточную линию, накапливающую не менее 2,3 % индолиновых алкалоидов, а содержание аймалина колебалось в ней в пределах 1,8—2,1 %.

Таким образом, на примере клеточной линии А нами была показана возможность повышения продуктивности и получения более продуктивных штаммов путем ступенчатой селекции на среде, содержащей 5-МТ. Отселектированные клеточные линии сохраняли устойчивость к антимаболиту при дальнейшем выращивании на обычной питательной среде в течение, по крайней мере, 1 года культивирования.

Условия выращивания и продуктивность. Накопление продуктов специализированного обмена клетками *in vitro*, как любой фенотипический признак, является результатом взаимодействия генотипа и условий среды. Создание оптимальных условий для реализации этого признака представляет определенную сложность. Она обусловлена, прежде всего, антагонизмом между процессами пролиферации и вторичного метаболизма. Эта трудность может быть решена в ряде случаев так называемым двухэтапным (многоэтапным) культивированием. Суть такого культивирования состоит в том, что на первых этапах роста клеток создаются условия для их интенсивного деления и прироста биомассы, а на последующих — для активного накопления целевых продуктов (см. [9, 121—128]).

Составы сред для каждого этапа создаются, как правило, эмпирически. Но здесь накоплен уже определенный опыт, позволяющий сделать некоторые обобщения. Наиболее интересной, по нашему мнению, является гипотеза, высказанная Воллосовичем [32]. По Воллосовичу, культивировать клетки растений следует, моделируя особенности трофики органов интактного растения. Для этого устанавливается соотношение минеральных элементов в том органе растения, где происходит наиболее интенсивное накопление целевых продуктов. На основе полученных данных проводится оптимизация питательной среды. У раувольфии змеиной при этом содержание алкалоидов группы индолина в культивируемых клетках прямо пропорционально концентрации углеводов в среде. Такой подход позволил, по данным А. Г. Воллосовича, достигнуть накопления аймалина до 4—6 %, что значительно выше, чем у исходной каллусной ткани — клеточной линии А ($0,3—0,5 \%$) и в корнях интактного растения ($0,3 \%$).

Однако и этот подход не универсален, поскольку функционирование клеток *in vitro* существенно отличается от такового *in vivo*. Это обусловлено не только нарушением коррелятивных связей организма и формированием новой биологической системы — популяции культивируемых клеток, где изменена регуляция физиологических процессов. Популяции культивируемых клеток генетически весьма гетерогенны, их геном подвержен значительным перестройкам. Изменяется не только структура генома, но и особенности его функционирования. В последнем случае для примера достаточно упомянуть, что культивируемые клетки многих изученных растений накапливают вторичные метаболиты либо вовсе не свойственные исходным растениям, либо синтезируемые в незначительном количестве или на какой-то определенной стадии онтогенеза, чаще всего ювенильной, а то и продукты незавершенного биосинтеза (см., например, [1, 10, 16, 29, 54, 129—141]). Следовательно, вопросы регуляции биосинтеза целевого продукта сложны и практически мало изучены. Тем не менее, полученные данные позволяют сделать предположение о том, что, по-видимому, в случае каждого штамма для наиболее полной реализации его генетических потенций необходимо подбирать условия выращивания индивидуально. Каждый штамм, даже родственные штаммы, проявляют специфическую реакцию на изменение условий выращивания. В наших исследованиях с раувольфией это было показано в эксперименте [50].

Изучали влияние светового и температурного режимов выращивания, концентрации углеводов и различных типов фитогормонов, а также ряда других факторов на продуктивность. Было установлено, что продуктивность клеточной линии А и полученных от нее штаммов К-20 и К-27 менялась по-разному при изменении условий культивирования. В ряде случаев изменения продуктивности были противоположными по направленности. Например, из данных, приведенных в табл. 8, видно, что увеличение количества сахарозы в питательной среде с 5 до 10 % вызвало увеличение накопления индолиновых алкалоидов у линии А и снижение продуктивности штамма К-20. Одновременное с этим снижение температуры выращивания до 19 °С у обоих штаммов выявило тенденцию к повышению продуктивности, а дальнейшее повышение концентрации сахарозы до 15 % — к снижению продуктивности обоих штаммов.

Таблица 8

Влияние разных концентраций сахарозы и пониженной температуры выращивания на продуктивность культивируемых клеток раувольфии змеиной (по [50] с дополнениями)

Вариант опыта	Накопление индолиновых алкалоидов, мг/л в сут	
	Линия А	Штамм К-20
27 °С, 5 % сахарозы (контроль)	3,65 ± 0,40	4,62 ± 0,30
27 °С, 10 % сахарозы	5,04 ± 0,30*	3,17 ± 0,40*
27 °С, 15 % сахарозы	1,96 ± 0,40*	1,85 ± 0,40**
19 °С, 10 % сахарозы	4,69 ± 0,40	5,03 ± 0,20

* Различия по сравнению с контролем достоверны на уровне значимости $P=95\%$; ** то же, $P=99,9\%$.

Данные, приведенные в табл. 9, свидетельствуют о разной степени возрастания уровня накопления аймалина у линии А и у штаммов К-20 и К-27 под влиянием одной и той же комбинации фитогормонов в питательной среде. В среднем у штамма К-27 содержание аймалина возросло почти в два раза, у штамма К-20 — в три, а у линии А — более чем в 18 раз. При этом обращает на себя внимание то, что при разном исходном (контрольном) накоплении аймалина у изученных штаммов на среде с фитогормонами обнаружен практически одинаковый минималь-

ный уровень, а у штаммов К-20 и К-27 — одинаковый и максимальный уровень аймалина. У линии А размах варьирования был значительно шире за счет сдвига в сторону максимальных значений, превышающих 19 %. Различия в реакции на изменение некоторых других факторов наблюдались и между штаммами К-20 и К-27.

Приведенный пример является, по нашему мнению, свидетельством большей гомогенности и выровненности отселектированных штаммов К-20 и К-27. Для дальнейшей работы по повышению продуктивности более перспективной является клеточная линия А, потенциал продуктивности которой, как видно из табл. 9, далеко не исчерпан. В лучших образцах этой линии при выращивании клеток в оптимизированных (но достаточно сложных) условиях накопление аймалина может достигать 20 %. Задача дальнейших исследований — стабилизировать накопление аймалина на этом уровне, который на два порядка превышает накопление аймалина в корнях интактных растений. Решение этой задачи повысит рентабельность и экономичность биотехнологического производства аймалина, а в итоге — обеспечит его конкурентоспособность по сравнению с традиционным путем получения аймалина из коры корней 5—7-летних растений некоторых видов раувольфии, выращиваемых в тропических условиях.

Заключение. Клеточные штаммы экономически важных растений можно условно разделить на две группы — выделяющие синтезируемые продукты специализированного обмена в среду и накапливающие эти продукты в клетках. Важные индолоиновые алкалоиды раувольфии культивируемыми клетками в питательную среду выделяются в незначительном количестве. Этот процесс можно интенсифицировать различными воздействиями, однако алкалоиды, в частности, аймалин, находящийся в питательной среде даже в незначительных количествах, приводит к гибели клеток. Следовательно, для раувольфии возможно два типа культивирования клеток для получения аймалина — полупроточный или накопительный режим. Наши исследования показали, что более экономичным является накопительный режим выращивания. При этом глубинное выращивание может быть экономически выгоднее, однако многолетние исследования позволили получить суспензионные культуры, накапливающие несколько более 1 % аймалина на 30-е сут роста. В то же время штаммы, выращиваемые поверхностным способом, способны накапливать 4—8 % аймалина, а в оптимальных условиях и до 20 %. Видимо, это обусловлено одной из особенностей тканевой культуры, заключающейся в том, что в отличие от суспензии она состоит из морфологически разных клеток, в том числе высокодифференцированных, часть которых выполняет функцию запасающих клеток [68, 69, 142]. Депонирование синтезируемого аймалина в таких клетках, видимо, и обеспечивает высокий уровень его накопления, способствуя более полной реализации генетических потенций штамма.

Приведенные результаты исследований свидетельствуют о том, что получение клеточных штаммов, накапливающих до 20 % от сухой массы веществ специализированного обмена, возможно не только для культур, синтезирующих продукты, практически нейтральные для роста клеток, и легко выделяющих их в питательную среду (например, шиконин), но и для культур, накапливающих высокотоксичные для клеток вещества, в нашем случае — аймалин. Однако для стабильной продукции, особен-

Таблица 9

*Влияние одной и той же комбинации фитогормонов в питательной среде на содержание аймалина в культивируемых клетках раувольфии (% от сухой массы)**

Штамм	Контроль	Опыт	
		Lim	M ± m
Линия А	0,46 ± 0,08	2,10—19,30	8,46 ± 0,87
К-20	0,78 ± 0,09	2,05—2,40	2,18 ± 0,20
К-27	1,20 ± 0,12	2,10—2,40	2,23 ± 0,18

* Данные получены совместно с Е. Г. Алхимовой.

но при крупномасштабном выращивании, учитывая высокий уровень генетической изменчивости и гетерогенности клеточных популяций и автоотбор на темп роста, а не на накопление целевого продукта, необходимо проводить систематический поддерживающий отбор. Применение такого отбора, как свидетельствуют наши данные и результаты выращивания культуры ткани в промышленных условиях на Харьковском химфармзаводе «Здоровье трудящимся», обеспечивает стабильную продуктивность клеточного штамма в течение многих лет.

Таким образом, популяции культивируемых клеток раувольфии змеиной характеризуются высоким уровнем структурно-функциональной изменчивости генома, что проявляется, в частности, в изменении структуры генома (числа и морфологии хромосом, количества ДНК, вариабельности последовательностей ДНК), в изменении спектра белков, спектра и количества синтезируемых алкалоидов. Используя высокий уровень спонтанной изменчивости, проведена клеточная селекция как с помощью метода поддерживающего отбора, так и селективных сред. Получены штаммы, накапливающие преимущественно один алкалоид — аймалин, содержание которого составляет в сумме синтезируемых алкалоидов 50 % и более (в интактных растениях содержание аймалина не превышает 5 % от суммы всех алкалоидов, накапливаемых в корнях). Оптимизация условий выращивания позволила достичь уровня накопления аймалина 6—8 %, а в отдельных случаях — до 20 % от сухой массы, что практически на два порядка выше природного.

Полученные данные дают основание для предположения о том, что дальнейшее изучение особенностей клеточного метаболизма *in vitro*, проведение селекционно-генетических и генноинженерных исследований, совершенствование технологии выращивания клеток раувольфии позволят стабилизировать и, возможно, превысить 20 %-й уровень накопления аймалина биомассой культивируемых клеток, получить высокопродуктивные штаммы раувольфии и по другим важным алкалоидам.

Автор посвящает эту работу светлой памяти товарища и коллеги, талантливейшего исследователя, высокоэрудированного специалиста в области клеточной биотехнологии лекарственных растений, доктора фармацевтических наук [Воллосовича Александра Георгиевича], скоропостижно ушедшего от нас в расцвете творческих сил.

В. А. Кунах

ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ ТА НАКОПИЧЕННЯ ІНДОЛІНОВИХ АЛКАЛОЇДІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ, RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH.

Резюме

Зроблено аналіз літературних даних та власних досліджень, виконаних у 1979—1993 рр. Головним результатом роботи за цей період є одержання нових клітинних штамів-продуцентів і розробка умов їх вирощування, що підвищило накопичення індолінового алкалоїду аймаліну до 6—8 %, а в окремих випадках — до 20 %. Це майже у 100 разів вище порівняно з 5—7-річними рослинами, що ростуть у тропіках.

V. A. Kunakh

GENOME VARIABILITY AND ACCUMULATION OF INDOLINE ALKALOIDS IN RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH. CELL CULTURE

Summary

Literature data and results of our studies performed in 1979—1993 were summarized. The major outcome of our investigations was the establishment of novel cell strains-producers and the development of conditions for their maintaining that increased the accumulation of indoline alkaloid, ajmaline, up to 6—8 % and occasionally up to 20 %. This is 100-fold higher than of inherent to 5—7 old plants growing in tropics.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология.— М., 1986.— С. 3—20.
2. Fowler M. W. Industrial applications of plant cell culture // Plant cell cult. technol.— Oxford etc., 1986.— P. 202—227.
3. Tanaka H. Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review // Process Biochem.— 1987.— 22, N 4.— P. 106—113.
4. Constabel F. Principles underlying the use of plant cell fermentation for secondary metabolite production // Biochem. and Cell. Biol.— 1988.— 66, N 6.— P. 658—664.
5. Ellis B. E. Natural products from plant tissue culture // Natur. Prod. Rept.— 1988.— 5, N 6.— P. 518—612.
6. Furuya Tsutomu. Production of useful compounds by cell cultures. *De novo* synthesis and biotransformation // J. Pharm. Soc. Jap.— 1988.— 108, N 8.— P. 675—696.
7. Heinlein P., Emery A. Processes with plant cell cultures // Biotechnol.— Weinheim, 1988.— Vol. 6b.— P. 213—248.
8. DiCosmo F., Facchini P. J., Kraml M. M. Cultured plant cells — the chemical factory within // Chem. Brit.— 1989.— 25, N 10.— P. 1001—1004.
9. Kreis W., Reinhard E. The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors // Planta med.— 1989.— 55, N 5.— P. 409—416.
10. Parr A. J. The production of secondary metabolites by plant cell cultures // J. Biotechnol.— 1989.— 10, N 1.— P. 1—26.
11. Pedersen H., Cho G. H., Kim D. et al. Mass transfer in plant cell systems // 8th Int. Biotechnol. Symp. (Paris, 1988): Proc.— Paris, 1989.— Vol. 1.— P. 480—488.
12. Rittershaus E., Brümmer B., Stiller W., Weiss A. Großtechnische Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen. Downstream Processing zur Produktgewinnung aus pflanzlichen Zellkulturen im großtechnischen Maßstab // Bioengineering.— 1989.— 5, N 3—4.— P. 51—54, 56—65.
13. Tabata M. Secretion of secondary products by plant cell cultures // 8th Int. Biotechnol. Symp. (Paris, 1988): Proc.— Paris, 1989.— Vol. 1.— P. 167—178.
14. Secondary metabolites used as food flavourins // Genet. Eng. and Biotechnol.— Monit.— 1990.— N 28.— P. 11.
15. Schmauder H.-P., Doebel P. Plant cell cultivation as a biotechnological method // Acta biotechnol.— 1990.— 10, N 6.— P. 501—516.
16. Zenk M. H. Plant cell cultures: a potential in food and biotechnology // Food Biotechnol.— 1990.— 4, N 1.— P. 461—470.
17. Cell-culture system to produce less-costly natural vanilla // Bioprocess. Technol.— 1991.— 13, N 1.— P. 7.
18. Goldstein W. E. Plant cell culture for production of natural ingredients // 14ème Colloq. sci. int. café (San Francisco, 14—19 juill., 1991).— Paris: ASIC, 1992.— P. 412—421.
19. Zafar R., Afri Vidhu, Datta Anirudha. Application of plant tissue and cell culture for production of secondary metabolites // Fitotherapie.— 1992.— 63, N 1.— P. 33—43.
20. Кузовкина И. Н., Чернышева Т. П., Альтерман И. Е. Характеристика штамма каллусной ткани руты душистой (*Ruta graveolens*), продуцирующего рутакридон // Физиология растений.— 1979.— 26, № 3.— С. 429—500.
21. Lindsey K., Yeoman M. M. Immobilised plant cell culture systems // Primary and Secondary Metab. Plant Cell Cult.— Berlin etc., 1985.— P. 304—315.
22. Rokem J. S., Tal B., Goldberg I. Methods for increasing diosgenin production by *Dioscorea* cells in suspension cultures // J. Natur. Prod.— 1985.— 48, N 2.— P. 210—222.
23. Staba E. J. Milestones in plant culture systems for the production of secondary products // Ibid.— P. 203—209.
24. Collinge M. Ways and means to plant secondary metabolites // Trends Biotechnol.— 1986.— 4, N 12.— P. 299—301.
25. Majerus F., Pareilleux A. Alkaloid accumulation in Ca-alginate entrapped cells of *Catharanthus roseus*: Using a limiting growth medium // Plant Cell Repts.— 1986.— 5, N 4.— P. 302—305.
26. Funk C., Gügler K., Brodelius P. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor) // Phytochemistry.— 1987.— 26, N 2.— P. 401—405.
27. Haldemann D., Brodelium P. Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica* // Ibid.— N 5.— P. 1431—1434.
28. Parr A. J. Secondary products from plant cell culture // Biotechnology in Agriculture.— New York: Alan R. Liss, 1988.— P. 1—34.
29. Reichling J., Beiderbeck R. Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis. Teil III: Sekundärstoffakkumulation in transformierten *in vitro* kulturen // GIT.— 1988.— 32, N 5.— P. 466—468.
30. Nagarajan R. P., Keshavarz E., Gerson D. F. Optimization of anthocyanin yield in a mutated cell line (*Daucus carota*) and its implications in large scale production // J. Ferment. Technol.— 1989.— 68, N 2.— P. 102—106.

31. Tanaka Atsuo. Cultured plant cells as the catalysts for bioreactor // Bioprod. and Bioproc.: 2nd Conf. Promote Jap. (U. S. Joint Proj. and Coop. Biotechnol.) (Lake Biwa, Japan, Sept. 27—30, 1986).— Berlin etc., 1989.— P. 3—12.
32. Vollosovich A. G. Some peculiarities of alkaloid accumulation in tissue culture of *Rauwolfia serpentina* // Highlights Mod. Biochem: Proc. 14th Int. Congr. Biochem. (Prague, 10—15 July, 1988).— Utrecht; Tokyo, 1989.— Vol. 2.— P. 1177—1182.
33. Wink M. Induction of alkaloid formation on plant cell cultures // Ibid.— P. 1183—1192.
34. Hirata Kazumasa, Horiuchi Masato, Ando Teru et al. Vindoline and catharanthine production in multiple shoot cultures of *Catharanthus roseus* // J. Ferment. Technol.— 1990.— 70, N 3.— P. 193—195.
35. Каранова С. Л., Шамина З. Б., Рапопорт И. А. Влияние НММ на изменчивость клеточных популяций диоскореи дельтовидной // Генетика.— 1975.— 11, № 5.— С. 35—40.
36. Каранова С. Л., Носов А. М., Пауков В. Н., Шамина З. Б. Продуктивность различных клеточных линий диоскореи дельтовидной // Культура клеток растений и биотехнология.— М., 1986.— С. 83—87.
37. Воллосович Н. Е., Воллосович А. Г., Ковалева Т. А. и др. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность // Растительные ресурсы.— 1976.— 12, № 4.— С. 578—583.
38. Кузовкина И. Н. Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности и перспективы использования в физиологии растений // Физиология растений.— 1992.— 39, № 6.— С. 1208—1214.
39. Садыкова Г. Д., Аханов А. У., Бурьянов Я. И. Использование генетической трансформации агробактериями для получения суперпродуктивных линий *Solanum laciniatum* // Биотехнология.— 1991.— № 5.— С. 33—41.
40. Булгаков В. П., Журавлев Ю. Н. Культуры трансформированных клеток растений как новый источник получения продуктов вторичного метаболизма // Успехи соврем. биологии.— 1992.— 112, № 3.— С. 342—349.
41. Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C. et al. New routes to plant secondary products // Biotechnology.— 1987.— 5, N 8.— P. 800—804.
42. Flores H. E., Hoy M. W., Pickard J. J. Secondary metabolites from root cultures // Trends Biotechnol.— 1987.— 5, N 3.— P. 64—69.
43. Mano Yoshihiro. Variation among hairy root clones and its application // Plant Tissue Cult. Lett.— 1989.— 6, N 1.— P. 1—9.
44. Christen P., Roberts M. F., Phillipson J. D., Evans W. C. Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid // Plant Cell Repts.— 1990.— 9, N 2.— P. 101—104.
45. Mukundan U., Hjortso M. A. Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*: A comparison with thiophene content in roots of intact plants // J. Exp. Bot.— 1990.— 41, N 232.— P. 1497—1501.
46. Ishimaru Kanji, Hirose Makoto, Takanashi Kutio et al. Tannin production in hairy root cultures of *Sanguisorba officinalis* L. // Plant Tissue Cult. Lett.— 1991.— 8, N 2.— P. 114—117.
47. Homeyer B. C., Fry C. Z., Roberts M. F. Alkaloid variations in hairy root clones of a *Datura candida* hybrid // J. Pharm. and Pharmacol.— 1991.— 43, Suppl.— P. 21P.
48. Кузовкина И. Н., Кислов Л. Д., Живописцева М. Н. и др. Акридоновые алкалоиды каллусной ткани *Ruta graveolens* // Химия природ. соединений.— 1984.— № 6.— С. 758—761.
49. Вахтин Ю. Б., Гужова И. В., Николаева Л. А., Кунах В. А. Гетерогенность культуры ткани раувольфии змеиной по содержанию аймалина // Цитология.— 1985.— 27, № 6.— С. 717—720.
50. Kunakh V. A., Alkhimova E. G., *Rauwolfia serpentina*: in vitro culture and the production of ajmaline // Med. and Aromat. Plants 2.— Berlin etc., 1989.— P. 398—416.
51. Brodelius P. Utilization of plant cell cultures for production of biochemicals // Hereditas.— 1985.— Suppl.— 3.— P. 73—81.
52. Courtois D. Utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture en vue de l'obtention et de la production de métabolites // Bull. Soc. bot. Fr. Actual. bot.— 1985.— 132, N 3—4.— P. 105—112.
53. Fujita Yasuhiro, Takahashi Shigeru, Yamada Yasuyuki. Selection of cell lines with high productivity of shikoin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells // Agr. and Biol. Chem., 1985.— 49, N 6.— P. 1755—1759.
54. Reichling J. Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis—Teil. II. // GIT.— 1985.— 29, N 9.— P. 854—856, 859—860, 965—967.
55. Bariaud-Fontanel A, Tabata M. Somaclonal variation in the berberine-producing capability of a culture strain of *Thalictrum minus* // Plant Cell Repts.— 1988.— 7.— P. 206—209.
56. Rai P. P. Anthraquinone formation in callus cultures of *Cassia podocarpa* // J. Natur. Prod.— 1988.— 51, N 3.— P. 492—495.

57. Deliu C., Tamas M., Ghisan D., Munteanu-Deliu C. Alkaloid productivity in various *Berberis parvifolia* cell lines // Contrib. bot. (Univ. Cluj-napoca).—1989.— P. 171—177.
58. Van der Heijden R., Verpoorte R., Ten Hoopen Hens J. G. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey // Plant Cell, Tissue and Organ Cult.—1999.—18, N 3.— P. 231—280.
59. Morris P., Rudge K., Cresswell R., Fowler M. W. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. V. Long-term maintenance of cells on a production medium // Ibid.—17, N 2.— P. 79—90.
60. Dougall D. K., Vogelien D. L. Anthocyanin yields of clonal wild carrot cell cultures: Effects of serial cloning plus selection for high on low yield // Ibid.—1990.—23, N 2.— P. 79—91.
61. Воллосович А. Г., Бутенко Р. Г. Культура ткани раувольфии змеиной как продуцент алкалоидов // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений.— М.: Наука, 1970.— С. 235—257.
62. Mitra G. C., Kaul K. N. In vitro culture of root and stem callus of *Rauwolfia serpentina* Benth. for reserpine // Indian J. Exp. Biol.—1964.—2, N 1.— P. 49—51.
63. Ohta S., Yatazawa M. Growth and alkaloid production in callus tissues *Rauwolfia serpentina* // Agr. and Biol. Chem.—1979.—43, N 11.— P. 2297—2303.
64. Stöckigt J., Pflitzner A., Firl J. Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. // Plant. Cell Repts.—1981.—1.— P. 36—39.
65. Jamamoto O., Yamada J. Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells // Ibid.—1986.—5, N 1.— P. 50—53.
66. Arens H., Deus-Neumann B., Zenk M. H. Radioimmunoassay for the quantitative determination of ajmaline // Planta med.—1987.—53, N 2.— P. 179—183.
67. Воллосович А. Г., Николаева Л. А., Жарко Г. Р. Культура тканей некоторых лекарственных растений из рода *Rauwolfia* // Растительные ресурсы.—1972.—8, № 3.— С. 331—338.
68. Каухова И. Е., Кунах В. А., Легейда В. С., Воллосович А. Г. Цитологическое изучение высокопродуктивной клеточной линии *Rauwolfia serpentina* Benth. при глубинном выращивании // Цитология и генетика.—1981.—15, № 3.— С. 33—37.
69. Кунах В. А., Каухова И. Е., Аллатова Л. К., Воллосович А. Г. Особенности поведения клеток в культуре тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // Там же.—1982.—16, № 5.— С. 6—10.
70. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А. Оптимизация состава макро-солей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растительные ресурсы.—1979.—15, № 4.— С. 516—528.
71. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Лисунова Н. А. Оптимизация состава макро-солей для культуры тканей раувольфии // Там же.—1982.—18, № 2.— С. 239—243.
72. Каухова И. Е., Воллосович А. Г., Цыганков В. А. Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Там же.—1981.—17, № 2.— С. 217—224.
73. Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Цитологическое изучение культуры ткани раувольфии (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Генетика.—1968.—4, № 5.— С. 5—13.
74. Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Действие азотистого иприта на культуру изолированных тканей раувольфии // Там же.—1972.—8, № 2.— С. 46—54.
75. Кунах В. А., Зосимович В. П. Влияние кинетина на уровень и типы аберраций хромосом в культуре тканей *Narlorarpus gracilis* // Там же.—1977.—13, № 8.— С. 1355—1365.
76. Кунах В. А., Аллатова Л. К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Narlorarpus gracilis* // Докл. АН СССР.—1979.—245, № 4.— С. 967—970.
77. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс // Цитология и генетика.—1980.—14, № 1.— С. 73—81.
78. Кунах В. А., Потопальский А. И., Ткачук З. Ю., Аллатова Л. К. Нормализация измененного кариотипа в популяции культивируемых клеток гаплолампуса под влиянием модифицированных РНК // Молекуляр. биология.— Киев: Наук. думка, 1982.— Вып. 32.— С. 52—56.
79. Кунах В. А., Адоини В. И., Аллатова Л. К. и др. Цитогенетические последствия действия нативных и модифицированных тифосфамидом РНК на культуру тканей *Narlorarpus gracilis* // Цитология—1985.—27, № 4.— С. 476—487.
80. Кунах В. А., Захлянюк О. В. Диплоидизация культуры тканей растений с помощью 5-урацил-тиоуредидглюкозы (тиацила) // Докл. АН СССР.—1984.—279, № 5.— С. 1241—1244.
81. Кунах В. А., Каухова И. Е., Николаева Л. А. и др. Зависимость продуктивности клеточных линий раувольфии змеиной от уровня плоидности культивируемых клеток // Там же.—1983.—270, № 4.— С. 979—982.
82. Захлянюк О. В., Лазуркевич З. В., Кунах В. А. и др. Ростовая активность 5-урацил-тиоуредидглюкозы (тиацила) // Физиология и биохимия культур. растений.—1985.—17, № 4.— С. 343—351.
83. Лазуркевич З. В., Губарь С. И., Шаламай А. С. и др. Ростовая активность замещенных 6-азаурацилов // Там же.— № 1.— С. 48—54.

84. Janaki A. Tetraploidy in *Rauwolfia serpentina* // Current Sci.—1962.—31.— P. 520—521.
85. Koul M. L. H. Natural polyploidy in *Rauwolfia serpentina* // J. Sci. Res. Banaras Hindu Univ.—1963—1964.—14, N 2.— P. 100—102.
86. Banerjee N., Sharma A. K. Chromosome constitution and alkaloid content in *Rauwolfia L.* (*Apocynaceae*) // Cytologia.—1989.—54, N 4.— P. 723—728.
87. Deus B., Zenk M.-H. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds // Biotechnol. and Bioeng.—1982.—24, N 9.— P. 1965—1974.
88. Николаева Л. А., Воллосович А. Г. Влияние стимуляторов роста на накопление биомассы и алкалоидов в суспензионной культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растительные ресурсы.—1977.—13, № 3.— С. 450—455.
89. Kutney J. P., Aweryn B., Chatson K. et al. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. XIII. Effects of bioregulators on indole alkaloid biosynthesis // Plant Cell. Repts.—1985.—4, N 5.— P. 259—262.
90. Khouri H. E., Ibrahim R. K., Rideau M. Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra* // Ibid.—1986.—5, N 6.— P. 423—426.
91. Rhodes M. J. C., Payne I., Robins R. J. Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. II. The effect of a range of auxins and cytokinins on the production of quinoline alkaloids // Planta med.—1986.—N 3.— P. 226—229.
92. Yoshikawa Nobuji, Fukui Hiroshi, Tabata Mamoru. Effect of gibberellin A₃ on shikonin production in *Lithospermum callus* cultures // Phytochemistry.—1986.—25, N 3.— P. 621—622.
93. Chung C.-T. A., Staba E. J. Effects of age and growth regulators on growth and alkaloid production in *Cinchona ledgeriana* leafshoot organ cultures // Planta med.—1987.—53, N 2.— P. 206—210.
94. Ohlsson A. B., Björk L. Effects of gibberellic acid on cardenolide accumulation by *Digitalis lanata* tissue cultures grown in light and darkness // J. Plant Physiol.—1988.—133, N 5.— P. 535—538.
95. Nigra H. M., Alvarez M. A., Giulietti A. M. The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum elegnifolium* Cav. calli // Plant Cell Plants.—1989.—8, N 4.— P. 230—233.
96. Ahuja A., Sambyal M., Kaushik J. P. Regulation of anthraquinone production by nutritional and hormonal factors in *Cassia fistula* callus cultures // Fitoterapia.—1991.—62, N 3.— P. 205—214.
97. Sauerwein M., Ishimaru K., Shimomura K. Indole alkaloids in hairy roots of *Amsonia elliptica* // Phytochemistry.—1991.—30, N 4.— P. 1153—1155.
98. Berlin J., Mollenschott C., DiCosmo F. Comparison of various strategies designed to optimize indole alkaloid accumulation of a cell suspension culture of *Catharanthus roseus* // Z. Naturforsch.—1987.—C42, N 9—10.— P. 1101—1108.
99. Кунах В. А. Изменчивость числа хромосом в онтогенезе высших растений // Цитология и генетика.—1978.—12, № 2.— С. 160—173.
100. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия // Проллиферация и дифференцировка.— М.: Наука, 1981.— С. 259—261.
101. D'Amato F. Polyploidy in cell differentiation // Caryologia.—1989.—42, N 3—4.— P. 183—211.
102. Кунах В. А., Костенюк И. А., Воллосович А. Г. Увеличение количества ядерной ДНК при биосинтезе алкалоидов в культуре тканей раувольфии змеиной // Докл. АН УССР.—1986.— № 7.— С. 62—65.
103. Соловьян В. Т., Костенюк И. А., Кунах В. А. Изменения генома культивируемых *in vitro* клеток раувольфии змеиной // Генетика.—1987.—23, № 7.— С. 1200—1208.
104. Соловьян В. Т., Захленюк О. В., Кунах В. А. Перестройки генома раувольфии в процессе культивирования *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 1.— С. 103—106.
105. Салина Е. А., Саиташев С. К., Вершинин А. В. и др. Гетерогенность быстро и умеренно реассоциирующей ДНК злаков // Докл. АН СССР.—1984.—279, № 4.— С. 994—999.
106. Соловьян В. Т., Попович В. А., Кунах В. А. Переустройство генома культивируемых клеток *Crepis capillaris* L. (Wallr.) // Генетика.—1989.—25, № 10.— С. 1768—1775.
107. Губарь С. И., Алхимова Е. Г., Лазурчевич З. В., Кунах В. А. Содержание нуклеиновых кислот и белков в клеточных штаммах *Rauwolfia serpentina* Benth. // Физиология растений.—1988.—35, № 1.— С. 113—121.
108. Pfizner A., Stöckigt J. Characterization of polynuridine aldehyde esterase, a key enzyme in the biosynthesis of sarpagine / aumaline type alkaloids // Planta med.—1983.—48.— P. 221—227.
109. Stöckigt J., Pfizner A., Keller P. J. Enzymatic formation of aumaline // Tetrahed. Lett.—1983.—24, N 24.— P. 2485—2486.
110. Stöckigt J. Enzymatic biosynthesis of monoterpene indole alkaloids: aumaline, sarpagine and vindole // New Trends in Nat. Prod. Chem.—1986.—26.— P. 497—511.
111. Вахтин Ю. Б., Гужова И. В., Николаева Л. А., Кунах В. А. Гетерогенность культуры тканей раувольфии змеиной по содержанию аймалина // Цитология.—1985.—27, № 6.— С. 717—720.

112. Вахтин Ю. Б. Генетическая теория клеточных популяций.— Л.: Наука, 1980.— С. 168.
113. Николаева Л. А., Вахтин Ю. Б., Гужова И. В. и др. Поддерживающий отбор в культуре ткани *Rauwolfia serpentina Benth.* // Доклады АН УССР—1985.— № 7.— С. 73—75.
114. Аллатова Л. К., Спиридонова Е. В., Константинова Е. П., Кунах В. А. Соматическая изменчивость — эффективный источник получения штаммов сверхпродуцентов вторичных метаболитов раувольфии змеиной // Новые направления биотехнологии: Всесоюз. конф. (Пушино, 3—5 окт., 1988).— Пушино, 1988.— С. 81.
115. Tremouillaux-Guiller J., Andreu F., Creche J. et al. Variability in tissue cultures of *Choisya ternata*. Alkaloid accumulation in protoclones and aggregate clones obtained from established strains // Plant Cell. Repts.—1987.—6, N 5.—P. 375—378.
116. Widholm J. M. Tissue culture and plant science.— London; New York: Acad. press, 1974.—P. 502—512.
117. Schallenberg J., Berlin J. 5-Methyltryptophan resistant cells of *Catharanthus roseus* // Z. Naturforsch.—1979.—C34, N 7—8.—P. 541—545.
118. Scott A. I., Muzukami H., Lee S.-L. Characterization of a 5-methyltryptophan resistant strain of *Catharanthus roseus* cultured cells // Phytochemistry.—1979.—18, N 5.—P. 795—798.
119. Scott A. J., Sin-Leung Lee, Culver M. G. et al. Indole alkaloid biosynthesis // Heterocycles.—1981.—15, N 2.—P. 1257—1261.
120. Кунах В. А., Аллатова Л. К. Клеточные линии раувольфии змеиной, устойчивые к 5-метилтриптофану. Селекция и продуктивность // Генет. механизмы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды: Тез. сообщ. (Иркутск, 8—12 июля, 1991).—Новосибирск, 1991.—С. 101.
121. Мэнтелл С. Г., Смит Г. Факторы культивирования, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений // Биотехнология с.-х. растений.—М., 1987.—С. 75—104.
122. Насов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений.—М.: Наука, 1991.—С. 5—20.
123. Morris P., Scragg A. H., Smart N. J., Stafford A. Secondary product formation by cell suspension cultures // Plant Cell Cult.: Pract. Approach.—Oxford; Washington: D. C., 1985.—P. 127—167.
124. Morris P. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus* II. Comparison of production media // Planta med.—1986.—N 2.—P. 121—126.
125. Yun Jeong Won, Kim Ji Hyeon, Yoo Young Je. Optimization of carotenoid biosynthesis by controlling sucrose concentration // Biotechnol. Lett.—1990.—12, N 12.—P. 905—910.
126. Byun Sang Yo, Pedersen H., Chin Chee-Kok. Two-phase culture for the enhanced production of benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *Escholtzia californica* // Phytochemistry.—1990.—29, N 10.—P. 3135—3139.
127. Kreis W., Reinhard E. Two-stage cultivation of *Digitalis lanata* cells: semicontinuous production of deacetyllanatoside C in 20-litre airlift bioreactors // J. Biotechnol.—1990.—16, N 1—2.—P. 123—135.
128. Tom R., Jardin B., Chavarie C., Archambault J. Effect of culture process on alkaloid production by *Catharanthus roseus* cells. I. Suspension cultures // J. Biotechnol.—1991.—21, N 1—2.—P. 1—20.
129. Кислов Л. Д., Кузовкина И. Н. Вторичные метаболиты культуры тканей *Boenninghausenia albiflora Reichb.* // Культура клеток растений и биотехнология.—М., 1986.—С. 66—69.
130. Гохар А., Кузовкина И. Н. Алкалоиды каллусных тканей гармалы обыкновенной // Физиология растений.—1988.—35, № 5.—С. 937—944.
131. Kurz W. G. W., Chatsou K. B., Constabel F. Biosynthesis and accumulation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* cultivars // Primary and Secondary Metab. Plant Cell Cult.—Berlin, 1985.—P. 143—153.
132. Banthorpe D. V., Branch S. A., Njar V. C. O. et al. Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids // Phytochemistry.—1986.—25, N 3.—P. 629—636.
133. Schütte H.-R. Secondary plant substances: Monoterpenoid indole alkaloids // Progr. Bot.: Struct. Bot. Physiol. Genet. Taxonomy. Geobot.—Berlin, 1986.—Vol. 58.—P. 151—166.
134. Tyler R. T., Kurz W. G. W., Panchuk B. D. Photoautotrophic cell suspension cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don): Transition from heterotrophic to photoautotrophic growth // Plant Cell Repts.—1986.—5, N 3.—P. 195—198.
135. Oksman-Caldentey K.-M., Vuorola H., Straub A., Hiltunen R. Variation in the tropene alkaloid content of *Hyoscyamus muticus* plants and cell culture clones // Planta med.—1987.—53, N 4.—P. 349—354.
136. Kutney J. P. Studies in plant tissue culture. The biosynthesis of complex natural products // Stud. Natur. Prod. Chem.—Amsterdam etc., 1988.—Vol. 2, pt. A.—P. 365—419.

137. *Ruyter C. M., Schübel H., Stöckigt J.* Novel glucoalkaloids from *Rauwolfia* cell cultures-acetyirauglucine and related glucosides // *Z. Naturforsch. C.*—1988.—43, N 7—8.—P. 479—484.
138. *Banthorpe D. V., Brown G. D.* Two unexpected coumarin derivatives from tissue cultures of *Compositae* species // *Phytochemistry.*—1989.—28, N 11.—P. 3003—3007.
139. *Ikuta Akira, Itokawa Hideji.* The triterpenes from *Stauntonia hexaphylla* callus tissues and their biosynthetic significance // *J. Natur. Prod.*—1989.—52, N 3.—P. 623—628.
140. *Pauthe-Dayde D., Rochd M., Henry M.* Triterpenoid saponin production in callus and multiple shoot cultures of *Gypsophila* spp. // *Phytochemistry.*—1990.—29, N 2.—P. 483—487.
141. *Siera M. I., Van der Heijden R., Schripsema J., Verpoorte R.* Alkaloid production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana pandacacui* // *Pianta med.*—1991.—57, N 6.—P. 543—547.
142. *Пучина Т. Н., Городнянская Л. М., Воллосович А. Г.* Анатомоморфологическое исследование культуры ткани раувольфии змеиной // *Растительные ресурсы.*—1980.—16, № 4.—С. 578—582.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН. Украины, Киев

Получено 26.08.93