

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ ТРАНСГЕННОЙ КОРНЕВОЙ КУЛЬТУРОЙ РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ (*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH.)

Трансгенная корневая культура раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. была обработана салициловой кислотой в концентрации 1 и 2 мМ. Исследовалось содержание суммарных индольных алкалоидов в ткани трансгенной корневой культуры, а также в культуральной среде в различные периоды после обработки. Установлено, что суммарная концентрация индольных алкалоидов в ткани трансгенной корневой культуры, обработанной салициловой кислотой, не отличается от таковой в контрольном опыте, в то время как содержание алкалоидов в культуральной среде после обработки салициловой кислотой увеличилось приблизительно в четыре раза по сравнению с содержанием индольных алкалоидов в культуральной среде контрольной культуры.

Введение. Одной из фундаментальных задач биотехнологии на сегодняшний день является поиск в используемой биотехнологической системе возможностей контроля и управления синтезом веществ, представляющих интерес для человека. Это утверждение полностью справедливо для культур клеток и тканей растений-продуцентов, которые часто используются как источники биологически активных веществ, обычно представляющих продукты вторичного синтеза растительной клетки.

Помимо используемых ранее подходов, направленных на получение высокопродуктивных клеточных линий и основывающихся на селекции клонов с высоким уровнем вторичного метаболизма, воздействию на культуру стрессовых факторов или изменении условий культивирования [1-6], несомненный интерес вызывает исследование действия на растительную клетку соединений, участвующих в растении в передаче гормонального сигнала и изменяющих (прямо или опосредованно) генетическую регуляцию синтеза различных классов веществ, в том числе и вторичных метаболитов [7-11]. Одним из таких веществ является салициловая кислота [8, 11]. Эндогенная салициловая кислота участвует в регуляции развития растений, увеличивает продолжительность цветения и ингибирует биосинтез этилена. Известно также, что салициловая кислота участвует в регуляции термогенеза растений [11].

Важную роль салициловая кислота играет также в реакциях устойчивости растений к патогенам, в частности, в реакции системной индуцированной устойчивости, связанной с изменением экспрессии ряда генов и синтезом специфических белков. Похожий эффект можно наблюдать и при экзогенном применении салициловой кислоты [8, 11]. Учитывая, что одной из реакций растения на стресс часто является увеличение уровня вторичного метаболизма [10, 12-15], можно предположить, что обработка культуры клеток растений салициловой кислотой оказывает подобное воздействие.

Одним из представителей семейства *Apoecanaceae*, насчитывающего около 2000 видов, является раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina* Benth.). Многие виды, относящиеся к этому семейству, характеризуются высоким уровнем синтеза фармацевтически ценных веществ. *Rauwolfia serpentina* Benth. — продуцент индольных алкалоидов, используемых в терапии кардиологических и сосудистых заболеваний и представляющих определенный интерес в качестве продуктов биотехнологического производства.

Исследования Волосовича [1], Кунаха и Алхимовой [4, 16] и др. продемонстрировали перспективность культуральных и селекционных

работ в направлении получения высокопродуктивных штаммов ку-
ры клеток этого растения. Однако исследования, проводившиеся с
каллусными линиями раувольфии змеиной, не включали в себя изуче-
ния воздействия веществ, выполняющих в растительных клетках роль
посредников при передаче гормонального сигнала, на уровень вторично-
го метаболизма в культуре. К тому же характер вторичного метаболизма
в культуре дифференцированных клеток, такой как трансгенная корне-
вая культура, может отличаться от такового для недифференцированной
клеточной культуры. Отличаться также может ответная реакция культу-
ры на различные стрессовые факторы.

Таким образом, исследование воздействия экзогенной салициловой
кислоты на трансгенную корневую культуру раувольфии змеиной —
продукента ряда фармакологически активных индольных алкалоидов —
представляет интерес как с точки зрения возможности регулирования
уровня синтеза вторичных метаболитов, так и с точки зрения изучения
механизмов этого процесса.

Материалы и методы. Биологический материал. В экспериментах ис-
пользовали трансгенную корневую культуру *Rauwolfia serpentina*, полу-
ченную нами ранее [17], которую культивировали на жидкой питатель-
ной среде MS [18] без гормонов (соотношение масса корней (г) / объем
среды (мл) составляло приблизительно 1/10) при температуре 25 °C в
темноте на шейкере возвратно-поступательного действия с частотой ко-
лебаний 100 в 1 мин. Длительность пассажа составляла 14 сут. Стоко-
вый раствор салициловой кислоты (Sigma) в этиловом спирте (концентрация
10 М) был добавлен в культуральную среду перед началом культиви-
рования, так что конечная концентрация салициловой кислоты в среде со-
ставляла 1 и 2 мМ. В связи с тем, что объем добавляемого этилового
спирта не превышал 0,02 % объема культуральной среды, в контрольные
культуры этиловый спирт добавлен не был. Образцы ткани отбирали на
1, 2, 4 и 7-е сутки пассажа. Для каждой концентрации салициловой кис-
лоты опыт проводился в шести повторностях. В трех повторностях ткань
отбирали на 0, 1, 2-е сутки культивирования после добавления салици-
ловой кислоты, а в трех — на 0, 4 и 7-е сутки культивирования, кроме
тех случаев, когда это было технически невозможно. Отобранную ткань
замораживали и хранили до высушивания при температуре -20 °C.
Ткань высушивали лиофильно. После окончания эксперимента культу-
ральную среду замораживали и хранили при температуре -20 °C.

Экстракция. Суммарные экстракты алкалоидов получали методом
Парра и соавт. [19] в нашей модификации [20] (протоколы № 1 и № 2).

Протокол № 1. Измельченную лиофильно высушенную ткань
экстрагировали 0,5 %-ным водным раствором ортофосфорной кислоты
(рН 2,0) (10 мл на 100 мг сухого веса) на шейкере в течение 5 ч (200 ко-
лебаний в 1 мин). Экстракт фильтровали, биомассу повторно экстраги-
ровали 0,3 объемами 0,5 %-ной фосфорной кислоты. Контролировали
значение рН и в случае необходимости доводили до 2,0, после чего до-
бавляли толуол (0,5 объема водного экстракта). Пробу интенсивно
встряхивали 1–2 мин и после отстаивания отбирали водную фазу с по-
мощью делительной воронки (порция 1). Эмульсию центрифугировали
при 8000 об/мин в течение 5 мин, после чего отбирали водную фазу и
соединяли с первой порцией. Доводили рН водной фазы до 8,0 (25 %-
ным водным раствором аммиака) и трижды экстрагировали из нее алка-
лоиды толуолом. Все порции органического экстракта объединяли и осу-
шали безводным сульфатом натрия. Затем толуольный экстракт упари-
вали на ротаторном испарителе при температуре 40 °C до объема 20 мл и
переносили во флакон. Упаривали на воздухе до образования густого
осадка, затем досушивали лиофильно.

Протокол № 2. Культуральную среду фильтровали 85 %-но
фосфорной кислотой. рН среды довели до 2,0 и экстрагировали
0,5 объемами толуола. Отбирали водную фазу и доводили значение рН
до 8,0 (25 %-ным водным раствором аммиака) и трижды экстрагировали
из нее алкалоиды толуолом (0,5 объема водной фазы). Все порции орга-
нического экстракта объединяли и осушали безводным сульфатом на-
трия. Затем толуольный экстракт упаривали на ротаторном испарителе
при температуре 40 °C до объема 20 мл и переносили во флакон. Упаривали
на воздухе до образования густого осадка, затем досушивали лио-
фильно.

Количественное исследование суммарных экстрактов алкалоидов. От-
деление концентрации раствора индольных алкалоидов в толуоле про-
водили на спектрофотометре «Gilford» при длине волны 285 нм. Спек-
трофотометр калибровали по стандартному раствору суммарного экстрак-
та алкалоидов трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной
полученному согласно протоколу № 1. Калибровочная кривая зависими-
сти оптической плотности от концентрации суммарного экстракта алка-
лоидов представлена на рис. 1. При построении графика был использо-
ван ПК TIKO PSX 325 с программой GRAPHER Copyright (C) 1987
Golden Software, Inc.

Концентрация индольных алкалоидов в культуральной среде и ткани трансгенной
корневой культуры раувольфии змеиной на 0, 1, 2, 4 и 7-е сутки после обработки
салициловой кислотой

Повтор- ность	Начальная концен- трация салици- ловой кислоты, мМ	Концентрация алкалоидов						
		в ткани, г/100г с.в.					в среде, мг/(100мл · 100 мг с. в.)	
		период культивирования, сут						
		0	1	2	4	7	2	7
RS1	0	3,448	—	3,000	—	—	0,618	—
RS2	0	0,680	0,188	0,194	—	—	0,856	—
RS3	0	3,673	2,170	1,916	—	—	0,274	—
Ср	0	2,600	1,179	1,703	—	—	—	—
RS4	0	0,640	—	—	0,717	0,263	—	1,009
RS5	0	0,849	—	—	1,083	—	—	0,913*
RS6	0	0,815	—	—	0,449	0,413	—	0,617
Ср	0	0,768	—	—	0,750	0,338	0,583	0,813**
RS1	1	3,837	1,789	0,647	—	—	2,549	—
RS3	1	1,814	0,474	0,628	—	—	1,076	—
RS7	1	1,479	1,433	0,643	—	—	3,519	—
Ср	1	2,376	1,232	0,639	—	—	—	0,342*
RS4	1	0,579	—	—	0,451	—	—	0,342*
RS6	1	0,912	—	—	0,457	—	—	0,415
RS8	1	1,380	—	—	0,557	0,414	—	0,596
Ср	1	0,957	—	—	0,488	0,414	2,381	0,379**
RS1	2	1,929	2,050	1,366	—	—	1,876	—
RS6	2	2,075	1,047	0,779	—	—	3,767	—
RS8	2	2,794	1,188	0,565	—	—	2,952	—
Ср	2	2,266	1,428	0,903	—	—	—	—
RS4	2	0,333	—	—	0,435	0,167	—	0,691
RS5	2	0,549	—	—	0,300	0,372	—	4,074
RS7	2	2,539	—	—	0,667	0,484	—	7,347
Ср	2	1,479	—	—	0,467	0,341	2,865	4,037

Примечания. Прочерк означает, что данные о концентрации алкалоидов отсу-
ствуют. * Содержание алкалоидов в среде анализировалось на 4-е сутки культивирова-
ния после добавления салициловой кислоты. ** Среднее значение концентрации алкалоидов
культуральной среде приведено для повторностей RS4 и RS6 (контроль). *** Сред-
нее значение концентрации алкалоидов в культуральной среде приведено для повторностей
RS4 и RS6 (1 мМ).

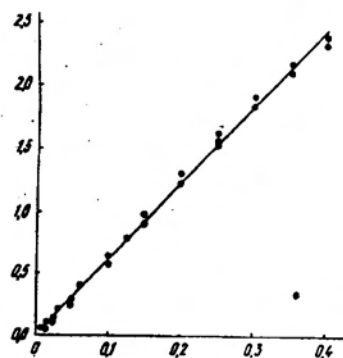


Рис. 1. График зависимости величины оптической плотности (по вертикали) от концентрации суммарного экстракта алкалоидов ткани трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной (по горизонтали), мг/мл. Измерения проводили при длине волны 285 нм

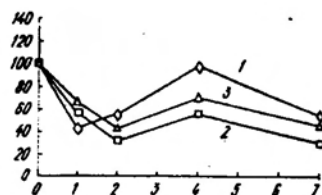


Рис. 2. Относительное содержание индольных алкалоидов, проц. от исходного уровня (по вертикали) в ткани трансгенной корневой культуры *Rauwolfia serpentina* Benth., по горизонтали — период культивирования, сут; 1 — контроль; 2 — 1 мМ салициловой кислоты; 3 — 2 мМ салициловой кислоты

Результаты исследований и их обсуждение. Метаболизм растительных клеток способен резко изменяться при действии на них патогена или патогенного токсина — возможно включение de novo различных метаболических путей, в том числе и вторичного синтеза [10, 12–15]. Показано, что одной из реакций растения на действие стрессового фактора является увеличение концентрации внутриклеточной жасмоновой кислоты [7, 10], поэтому предположили, что жасмонаты являются соединениями, связанными со стрессовыми реакциями растительных клеток. Жасмоновая кислота, в частности, является сигнальной молекулой, которая синтезируется в растениях в ответ на различные стрессы и влияет на экспрессию генов на многих уровнях [7]. Было также установлено, что аккумуляция эндогенной жасмоновой кислоты и ее производного — метилжасмоната — сопровождается индукцией биосинтеза ряда соединений вторичного метаболизма в культуре клеток растений, в частности, *Eschscholtzia californica* [21]. К аналогичному результату приводит обработка культуры клеток экзогенными жасмонатами [10].

Недавно было показано, что салициловая кислота также выступает в качестве эндогенной сигнальной молекулы, необходимой для индукции в растении так называемой реакции системной индуцируемой устойчивости к ряду патогенов, сопровождающейся синтезом специфических белков [8, 22]. Поэтому было логичным предположить, что обработка культуры клеток экзогенной салициловой кислотой также будет влиять и на характер вторичного синтеза в растении.

Трансгенная корневая культура *Rauwolfia serpentina* Benth. была обработана салициловой кислотой в концентрации 1 и 2 мМ. Ткань для анализа отбиралась на 0, 1, 2, 4 и 7-е сутки пассажа после добавления салициловой кислоты. Экстракция суммы индольных алкалоидов из ткани проводилась по протоколу № 1. Также исследовалось суммарное содержание индольных алкалоидов в культуральной среде. В этом случае экстракция проводилась в соответствии с протоколом № 2.

При изучении содержания алкалоидов в ткани культуры на 0, 1, 2, 4 и 7-е сутки после добавления салициловой кислоты достоверных ($P = 0,95$) различий между суммарными концентрациями индольных ал-

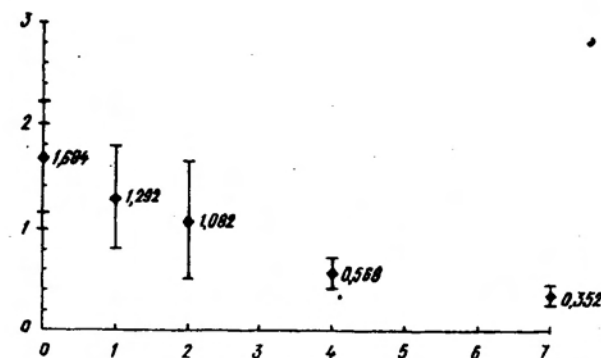


Рис. 3. График изменения содержания суммы индольных алкалоидов в ткани трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной в ходе культивирования: по вертикали — концентрация алкалоидов, г/100 г с. в.; по горизонтали — период культивирования, сут

калоидов в ткани опытных и контрольных культур обнаружено не было (таблица) [23]. Но как в опытных, так и в контрольных культурах наблюдалось уменьшение концентрации алкалоидов в ткани в ходе культивирования (таблица, рис. 2). Сравнение средних значений концентраций алкалоидов в ткани в различные периоды культивирования как в контрольных, так и в обработанных салициловой кислотой культурах выявило достоверное ($P = 0,95$) различие при анализе трех соответствующих повторностей контрольных или опытных вариантов только в одном случае: на 2-е сутки культивирования после добавления салициловой кислоты (2 мМ) концентрация индольных алкалоидов в ткани культуры уменьшилась с $2,266 \pm 0,524$ до $0,903 \pm 0,469$ г/100 г с. в. Наблюдаемый низкий уровень достоверности при статистическом анализе данных можно объяснить малой величиной исследуемой выборки.

Сравнивая средние значения содержания индольных алкалоидов в ткани всех исследуемых вариантов (обработанных салициловой кислотой в концентрации 1 мМ, 2 мМ и контрольных повторностей) в различные периоды культивирования, мы получили достоверное ($P = 0,95$) различие между концентрацией внутриклеточных алкалоидов в «нулевой» точке и их концентрацией в ткани на 4-й и 7-й день культивирования (рис. 3). Содержание алкалоидов уменьшилось с $1,684 \pm 0,531$ мг/100 г с. в. в начале культивирования («нулевая точка») до $0,568 \pm 0,151$ и $0,352 \pm 0,093$ мг/100 г с. в. соответственно на 4-е и 7-е сутки после добавления салициловой кислоты.

Уменьшение концентрации индольных алкалоидов в ткани трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной в ходе культивирования может свидетельствовать об усилении экскреции этих метаболитов в культуральную среду, что подтверждают приведенные ниже данные.

Обработка салициловой кислотой в концентрации 2 мМ привела к изменению количественного содержания алкалоидов в культуральной среде (таблица). Концентрация алкалоидов в среде в опытной линии составила на 2-е сутки после добавления салициловой кислоты $2,865 \pm 1,073$ мг/(100 мл · 100 мг с. в.), что достоверно ($P = 0,95$) превышает соответствующее значение для контроля ($0,583 \pm 0,331$) в 4,91 раза (рис. 4).

На 7-е сутки после обработки культуры салициловой кислотой (2 мМ) концентрация алкалоидов в среде увеличилась по сравнению с контролем в 4,97 раза (с $0,813 \pm 0,384$ до $4,037 \pm 3,766$ мг/100 мл · 100 мг с. в.) (рис. 5). Ма-

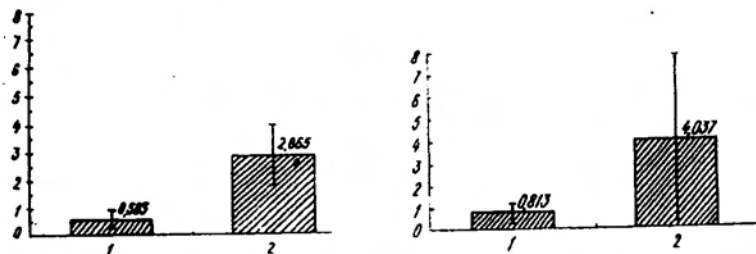


Рис. 4. Содержание суммы индольных алкалоидов в культуральной среде трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной на 2-е сутки культивирования: по вертикали — концентрация алкалоидов в культуральной среде, мг/100 мг с. в. · 100 мл; по горизонтали — 1 — контроль; 2 — 2 мМ салициловой кислоты

Рис. 5. Содержание суммы индольных алкалоидов в культуральной среде трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной на 7-е сутки культивирования: по вертикали — концентрация алкалоидов в культуральной среде, мг/100 мг с. в. · 100 мл; по горизонтали — 1 — контроль; 2 — 2 мМ салициловой кислоты

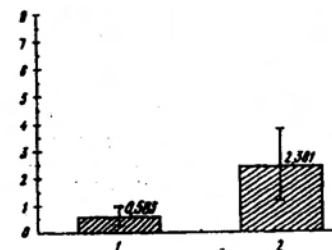


Рис. 6. Содержание суммы индольных алкалоидов в культуральной среде трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной на 2-е сутки культивирования: по вертикали — концентрация алкалоидов в культуральной среде, мг/100 мг с. в. · 100 мл; по горизонтали — 1 — контроль; 2 — 1 мМ салициловой кислоты

лая величина исследуемой выборки не позволила получить достоверное различие между этими величинами.

Обработка трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной салициловой кислотой в концентрации 1 мМ привела к увеличению концентрации алкалоидов, выделившихся в культуральную среду на 2-е сутки после добавления салициловой кислоты, в 4,08 раза по сравнению с контролем (рис. 6). Эти величины составляют соответственно $2,381 \pm 1,392$ и $0,583 \pm 0,331$ мг/100 мл · 100 мг с. в.

Таким образом можно сделать вывод, что обработка салициловой кислотой трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной в концентрации 1 и 2 мМ ведет к увеличению приблизительно в 4 раза концентрации алкалоидов, выделяемых в культуральную среду. К сожалению, незначительный объем выборки не позволяет достоверно оценить различия в уровне экскретируемых в культуральную среду алкалоидов при обработке культуры салициловой кислотой в концентрации 1 и 2 мМ. Концентрация индольных алкалоидов в ткани трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной уменьшается к концу исследуемого периода культивирования как в контрольных, так и в опытных вариантах. Достоверного ($P = 0,95$) различия между содержанием индольных алкалоидов в ткани культур, обработанных салициловой кислотой в концентрации 1, 2 мМ, и контрольными вариантами в различные периоды культивирования найдено не было.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что салициловая кислота участвует в растении не только в регуляции экспрессии ряда генов, определяющих реакцию системной индуцируемой устойчивости, но и способна изменять характер вторичного метаболизма в расти-

тельных клетках, что может указывать общность регуляторных механизмов этих процессов.

Способность экскретировать алкалоиды в культуральную среду является важной биотехнологической характеристикой культуры с точки зрения возможности культивирования ткани в биореакторах с целью получения коммерчески значимых количеств интересующих человека продуктов вторичного синтеза [24]. Выделение вторичных метаболитов в культуральную среду трансгенными корневыми культурами было зафиксировано как в процессе культивирования ткани при стандартных условиях [25], так и после обработки элиситорами [15], однако этот процесс не всегда характерен для трансгенных корневых культур. Для каллусных культур раувольфии змеиной не было отмечено высокого уровня экскреции алкалоидов в культуральную среду [26], поэтому выделение индольных алкалоидов в питательную среду трансгенной корневой культуры раувольфии змеиной при стандартных условиях культивирования и усиление этого процесса в несколько раз при обработке культуры салициловой кислотой является ценным свойством культуры, в перспективе позволяющим воздействовать на уровень вторичного синтеза в условиях промышленного культивирования.

SUMMARY. *Rauwolfia serpentina* hairy root culture has been treated with 1 mM and 2 mM salicylic acid (SA). The total indole alkaloid content in hairy root tissue and in culture medium for different cultivation periods after treatment was investigated. No remarkable differences were detected either in control or experimental subculture tissue when the concentration of the indole alkaloids released to the cultural medium after SA treatment was about 4-fold increase if compared with control.

РЕЗЮМЕ. Трансгенну кореневу культуру раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. було оброблено салициловою кислотою в концентрації 1 та 2 мМ. Досліджували вміст суми індольних алкалоїдів в тканині трансгенної кореневої культури, а також в культуральному середовищі в різні періоди після обробки. Встановлено, що сумарна концентрація індольних алкалоїдів в культуральній середовищі трансгенної кореневої культури, яку було оброблено салициловою кислотою, не відрізняється від концентрації суми алкалоїдів у контрольному досліді, а той час як вміст алкалоїдів у культуральному середовищі після обробки салициловою кислотою збільшився приблизно в чотири рази у порівнянні з вмістом індольних алкалоїдів у культуральному середовищі контрольної культури.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волосович Н. Е., Волосович А. Г., Ковалева Т. А. и др. Штаммы культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность // Растит. ресурсы. — 1976. — 12 № 4. — С. 578–583.
2. Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Буценко Р. Г. Действие азотистого иприта на культуру изолированных тканей раувольфии // Генетика. — 1972. — 8, № 2. — С. 46–54.
3. Yamamoto O., Yamada Y. Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells // Plant Cell Rep. — 1986. — 5. — P. 50–53.
4. Kunakh V. A., Alkhimova E. G. *Rauwolfia serpentina*: in vitro culture and the production of ajmaline // Biotech. in Agricult. Forest. Medicin. Aromat. Plants II. / Ed. Y. P. S. Bajaj. — Berlin: Springer-Verlag, 1989. — 7. — P. 398–416.
5. Smith J. I., Smart N. J., Kurz W. G. W. et al. The use of organic and inorganic compounds to increase the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures // J. Exp. Bot. — 1987. — 38. — P. 1501–1506.
6. Smith J. I., Quesnel A. A., Smart N. J. et al. The development of a single-stage growth and indole alkaloid production medium for *Catharanthus roseus* (L.) G. Don suspension culture // Enzyme Microb. Technol. — 1987. — 9. — P. 466–469.
7. Reinbothe S., Mollenhauer B., Reinbothe Ch. JIPs and RIPs: The Regulation of plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and pathogens // The Plant Cell. — 1994. — 6. — P. 1197–1209.
8. Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B. et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic Acquired Resistance // Science. — 1993. — 261. — P. 754–756.

9. Hildmann T., Ebner M., Pena-Cortes H. et al. General role of abscisic acid in gene activation as a result of mechanical wounding // *Plant Cell*. — 1992. — 4. — P. 1157–1170.
10. Gundlach B., Muller M. J., Kutchan T. M. et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced Plant cell cultures // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* — 1992. — 89. — P. 2389–2393.
11. Raskin I. Role of salicylic acid in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1992. — 43. — P. 439–463.
12. Signs M. W., Flores H. E. The biosynthetic potential of plant roots // *BioEssays*. — 1990. — 12, № 1. — P. 7–13.
13. Dunlop D., Curtis W. Synergistic responses of plant hairy root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation // *Biotechnol. Prog.* — 1991. — 7, № 5. — P. 434–438.
14. Malpathak N. P., David S. B. Stimulation of solasodine production by combining fungal elicitors and immobilised cell suspension cultures of *Solanum surattense* Burm // *Biotechnol. Lett.* — 1992. — 14, № 10. — P. 965–968.
15. Signs M. W., Flores H. E. Elicitation of sesquiterpene phytoalexin biosynthesis in transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* L. // *Plant. Physiol.* — 1989. — 89, № 4 (S). — P. 135.
16. Акимов Е. Г. Генетическое и физиолого-биохимическое изучение высокопродуктивных штаммов культивируемых клеток *Rauwolfia serpentina* Benth. : Дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1989. — 128 с.
17. Шегудько Ю. В., Костенюк Н. А. Динамика роста и содержание суммы алкалоидов в трансгенной корневой культуре раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // *Цитология и генетика*. — 1994. — 28, № 4. — С. 35–38.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — 5, № 13. — P. 473–497.
19. Zarr A. J., Peerless A. C. J., Hamill J. D. et al. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus* // *Plant Cell Rep.* — 1988. — 7, № 5. — P. 309–312.
20. Kostenyuk I. A., Lubarets O. F., Endre S. et al. Somatic hybridization in the Family Apocynaceae (*Catharanthus*, *Rauwolfia*, *Rhazya*, and *Vinca* Species) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry* / Ed. J. P. S. Bajaj. Vol. 27. Somatic Hybridization in Crop Improvement I. — Berlin : Springer — Verlag, 1994. — P. 405–424.
21. Schumacher H.-M., Gundlach H., Fiedler F., Zenk M. H. Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures // *Plant Cell Rep.* — 1987. — 6. — P. 410–413.
22. Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection // *Science*. — 1990. — 250. — P. 1002–1004.
23. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. школа, 1980. — 293 с.
24. Roots need homes too... // *Bioeng. news*. — 1991. — 12, № 42. — P. 5.
25. Flores H., Hoy M., Pickard J. Secondary metabolites from root cultures // *Trends Biotechnol.* — 1987. — 5, № 3. — P. 64–69.
26. Кунах В. А. Геномная изменчивость и накопление индолоидных алкалоидов в культуре клеток раувольфии змеиной, *Rauwolfia serpentina* Benth. // *Биополимеры и клетка*. — 1994. — 10, № 1. — С. 23–30.

Ин-т клеточной биологии и генет. инженерии
НАН Украины, Киев

Поступила 07.08.96