

УДК 577.3

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ

Н.С. Сиянова, С.Н. Неуструева

Аннотация

Одной из задач биотехнологии является получение лекарственных препаратов из культуры ткани растений. Каллус *Rauwolfia serpentina* Benth. является источником многих алкалоидов, имеющих фармацевтическое значение. Центральное место в ряду алкалоидов раувольфии змеиной занимает аймалин. Наиболее эффективное накопление биомассы, богатой алкалоидами, достигается подбором оптимальных условий культивирования. Установлена стимуляция роста каллуса при действии биназы, панкреатической дезоксирибонуклеазы, селена. Стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов в этой культуре наблюдалась под влиянием биназы, света, абсцизовой кислоты, инфицирования, фитагеля, селена, ванадия, кальция и цинка. Разработаны приемы воздействия этих факторов, обеспечивающие стимуляцию. Под влиянием экстремальных факторов происходит стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов, что указывает на их антистрессовую и фитонцидную функцию. Рассматриваются возможные механизмы действия указанных факторов. Исследованные факторы можно рекомендовать для стимуляции накопления биомассы и аймалиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной.

Ключевые слова: биотехнология, раувольфия змеиная, стимуляция роста каллуса, алкалоиды.

*Светлой памяти
научного руководителя,
профессора
Виктора Георгиевича Винтера
посвящается*

Введение

Одной из задач биотехнологии является получение лекарственных препаратов из культуры ткани растений. Применение с этой целью культур растительных клеток и тканей отличается рядом преимуществ по сравнению с использованием плантационного и дикорастущего сырья: возможность круглогодичного выращивания биомассы, независимость от климатических и географических факторов, стандартность и более высокое качество сырья.

Тропическое растение из семейства кутровых (*Apocynaceae*) раувольфия змеиная *Rauwolfia serpentina* Benth. является источником многих индольных алкалоидов, широко применяемых в медицинской практике в качестве гипотензивных, противоаритмических и седативных лекарственных средств. Централь-

ное место в ряду алкалоидов этого растения занимает аймалин. Аймалин – антиаритмический препарат, эффективное лекарственное средство при лечении сердечно-сосудистой системы. Поскольку раувольфия змеиная является эндемическим видом, находящимся под угрозой уничтожения, и отличается медленным темпом роста и относительно низким содержанием аймалиновых алкалоидов, в настоящее время эти соединения получают из культивируемых *in vitro* тканей этого растения.

К настоящему времени уже получены штаммы каллусных культур раувольфии змеиной, дающие в 5 раз больше аймалиновых алкалоидов, чем интактное растение, а также разработаны для этих штаммов питательные среды, которые одновременно стимулируют нарастание биомассы и накопление в ней алкалоидов [1–3]. Однако не прекращаются поиски факторов, увеличивающих продуктивность полученных штаммов. И дальнейшее повышение продуктивности культуры ткани раувольфии змеиной остается актуальной задачей для исследователей.

В связи с этим на кафедре биохимии Казанского государственного университета с 1988 г. начались исследования, целью которых была оптимизация условий выращивания каллуса раувольфии змеиной для стимуляции накопления биомассы и алкалоидов этой культурой. Работа проводилась под руководством доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии КГУ Виктора Георгиевича Винтера, который с большим энтузиазмом хотел наладить промышленное получение аймалина.

Объектом исследования была каллусная культура раувольфии змеиной клеточной линии А и штамма К-27, которые были любезно предоставлены В.П. Комовым, заведующим кафедрой биологической химии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии.

Наиболее эффективное накопление биомассы, богатой алкалоидами, в культуре ткани раувольфии змеиной можно получить подбором оптимальных условий культивирования: среды и режима выращивания, а также регуляторов роста.

1. Влияние биназы на рост и накопление алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной

В качестве регулятора роста нами использовалась рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа). В ряде работ [4–7] было показано, что рибонуклеазы могут стимулировать рост различных организмов (бактерий, дрожжей и высших растений). Нами исследовалось влияние различных концентраций биназы, внесенных в питательную среду, на рост и накопление алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной клеточной линии А [8]. До этого подобных исследований на каллусе раувольфии змеиной не проводилось. Экономически выгодная низкая концентрация биназы 10^{-4} мг/мл, внесенная в среду в одном пассаже, не давала достоверного увеличения биомассы, хотя наблюдалась некоторая тенденция к стимуляции. Поэтому были проведены опыты по многократному пассированию каллуса на питательной среде с биназой в этой концентрации с целью определить влияние этого приема на рост культуры ткани раувольфии змеиной и содержание в ней аймалиновых алкалоидов [9]. По прошествии нескольких пассажей каллуса на среде с биназой наблюдался достоверный эф-

ффе́кт стимуля́ции прироста биомассы (61%) и накопления аймалиновых алкалоидов (82–121%). Под эффектом стимуляции понимается увеличение какого-либо показателя в процентах от контроля. Такой эффект стимуляции сохранялся длительное время. И только начиная с 22 пассажа эффект стимуляции прироста биомассы снижался до 16% при сохранении на высоком уровне эффекта стимуляции накопления алкалоидов (103%). В 27-м пассаже в варианте с биназой прирост биомассы был ниже на 43% по сравнению с контролем, хотя стимуляция накопления алкалоидов составляла 69%.

Нами также исследовалось влияние биназы на динамику основных метаболических процессов в каллусе раувольфии змеиной клеточной линии А. Биназа, внесенная при многократном пассировании на поверхность питательной среды в концентрации 10^{-5} мг/мл, вызывала существенные изменения в первичном и вторичном обмене [10].

На начальных этапах роста культуры и до середины пассажа влияние биназы характеризуется активным стимулирующим действием на процессы клеточного роста. Биназа стимулировала процесс деления и дифференцировки клеток, увеличивая интенсивность и время протекания. Это подтверждают и данные по содержанию рибонуклеиновых кислот и белков. В первые дни роста каллусной ткани их количество под влиянием биназы возрастало, что может свидетельствовать об усилении деления клеток. Стимулирующее действие биназы на синтез РНК и белков было также ранее обнаружено и на дрожжах [11].

В варианте с биназой повышалась оводненность ткани раувольфии змеиной. Это, по-видимому, связано со стимуляцией роста ткани за счет растяжения клеток, подобно действию фитогормонов.

Указанные изменения должны привести к значительному приросту биомассы каллуса в более поздние сроки, что и наблюдалось [8, 9].

Влияние биназы на показатели первичного обмена в стационарную фазу роста (после 43–50 сут) незначительно. Исключением является уровень рибонуклеазной активности. После 50 сут в варианте с внесением биназы этот показатель значительно ниже, чем в контроле. Вероятно, это связано со стимуляцией биназой образования фенольных соединений. Известно, что многие фенольные соединения являются ингибиторами различных ферментов, в том числе и рибонуклеаз [12].

Действие биназы в конце пассажа направлено на торможение процессов старения культуры. В этот период биназа заметно снижала рибонуклеазную активность и поддерживала количество белка в каллусе на постоянно высоком уровне по сравнению с контролем. В этой связи биназа сходна с цитокининами – фитогормонами, способными останавливать старение растительной ткани [13].

Существенное влияние биназа оказала и на динамику накопления продуктов вторичного обмена: суммы индольных алкалоидов, аймалиновых и резерпиновых алкалоидов и фенолов. Из полученных экспериментальных данных можно сделать ряд выводов, полезных с практической точки зрения. Применение биназы при поверхностном способе внесения как стимулятора накопления аймалиновых алкалоидов в раувольфии змеиной клеточной линии А целесообразно при длительности культивирования 60–65 сут. В этом случае наблюдается максимальный эффект стимуляции (52%). Для накопления резерпиновых

алкалоидов оптимальное время культивирования 40–45 сут (эффект стимуляции 24%), а суммы индольных алкалоидов – 70 сут (эффект стимуляции 24%).

Выяснению механизма стимулирующего действия экзогенных нуклеаз посвящены работы сотрудников кафедры микробиологии КГУ. Исследования, проведенные Б.М. Куриненко с сотрудниками [14] показали, что биологические эффекты нуклеодеполимераз обусловлены ассоциативными свойствами ферментов с мембранными структурами нуклеотидной природы, а не с каталитической активностью. А.И. Колпаков и Ф.Г. Куприянова-Ашина [15] стимулирующий эффект экзогенных РНКаз объясняют их мембранотропным действием. Они предполагают, что экзогенные РНКазы служат сигналами к запуску пролиферативных процессов через систему вторичных посредников. Ими установлено, что под действием экзогенной биназы изменяется ионная проницаемость дрожжей, и происходит увеличение скорости поступления кальция в клетку в 2.5 раза. При этом наблюдается возрастание активности мембранного фермента аденилатциклазы. Оно коррелирует с повышением количества продуктов реакции цАМФ в клетке. Увеличение концентрации кальция и цАМФ сопровождается повышением активности Ca^{2+} - и цАМФ-зависимых киназ, с действием которых связано активирование многих белков. Все это может привести к усилению синтеза продуктов первичного и вторичного метаболизма.

По-видимому, подобное увеличение концентрации кальция при действии биназы может происходить и в клетках культуры ткани раувольфии змеиной, что должно способствовать накоплению алкалоидов. Кальций в основном накапливается в стареющих клетках растений, при этом взаимодействует с кальциевым рецептором – белком кальмодулином, который активирует процессы метаболизма, в частности синтез алкалоидов [16, 17]. Установлено И.Е. Кауховой и др. [18], что в первые 28–30 сут клетки культуры ткани раувольфии змеиной штамма К-27 незначительно потребляют кальций из питательной среды, в дальнейшем увеличивается его поглощение и в то же время начинается интенсивный синтез аймалиновых алкалоидов.

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность использования биназы для стимуляции накопления биомассы и алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной.

2. Влияние экзогенной дезоксирибонуклеазы на рост клеток растений

Выращивание растений в стерильных условиях, получение каллусных и суспензионных культур клеток растений – основные этапы в клеточной инженерии растений, при клональном размножении безвирусных растений, при промышленном получении продуктов специализированного обмена растений с использованием суспензионных и каллусных культур клеток растений. Интенсивность роста клеток растений в культуре и их продуктивность находятся в прямой зависимости от условий культивирования: состава питательных сред, температуры, аэрации и других факторов. Исследованиями М.И. Беляевой и ее учеников (Казанский государственный университет) было показано, что добавление в культуральную среду дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) стимулирует рост и деление клеток микроорганизмов [19–23]. Данные о влиянии ДНКаз на растительные объекты отсутствовали в литературе.

Цель настоящей работы – изучение влияния панкреатической ДНКазы на рост клеток растений. В опытах использовалась панкреатическая ДНКазы фирмы «Serva». Исследования проведены на трех видах растений: раувольфия змеиная, картофель, пшеница.

Раувольфия змеиная: линия А, каллусная культура, ДНКазы вносились при посеве на поверхность агаризованной среды. Оценку прироста биомассы проводили на 60-е сутки культивирования. Эффект стимуляции зависел от концентрации добавленного фермента. Наибольшая стимуляция роста каллуса наблюдалась при концентрации ДНКазы $1 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. Пассирование каллуса с ДНКазой этой концентрации (7 пассажей) показало стимуляцию роста на 35–38%.

Картофель: суспензионная и каллусная культуры, а также стерильная культура целых растений картофеля (сорт Надежда). В случае каллусной культуры картофеля работа проводилась на двух типах каллуса: быстрорастущего (сорт Надежда) и медленно растущего (сорт Лорх). При выращивании каллуса и стерильных целых растений фермент вносили при посеве на поверхность агаризованной среды. Оценка прироста сырой биомассы каллуса и целых растений проводилась через месяц, сухой массы клеток суспензии – через две недели роста культуры. Добавление ДНКазы в культуральную среду суспензионных клеток картофеля оказывало стимулирующее действие на рост культуры. Эта стимуляция зависела от концентрации добавленного фермента. Значительное стимулирование роста клеток картофеля в суспензионной культуре отмечалось при концентрации ДНКазы $125 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (на 141% по сравнению с контролем). Характер действия исследованных концентраций ДНКазы на рост каллуса выражается типичной одновершинной кривой. Наибольшая стимуляция роста каллуса наблюдалась при концентрации ДНКазы $1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл: эффект стимуляции быстрорастущего каллуса составил 82.9%, а медленно растущего каллуса – 184%. Следовательно, стимулирующий эффект ДНКазы проявился в большей степени в случае медленно растущего каллуса. Добавление ДНКазы в питательную среду при выращивании целых растений привело к стимуляции роста надземной части (на 115% при концентрации фермента $5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл), в то время как рост корней затормаживался. Таким образом, обнаружено стимулирующее действие панкреатической ДНКазы на рост клеток картофеля в суспензионной и каллусной культурах, а также целых стерильных растений. Установленный стимулирующий эффект ДНКазы может найти практическое применение в биотехнологии там, где имеет место выращивание каллуса, суспензионной культуры и стерильных растений.

Нами исследовалось влияние синхронизации клеточных делений в каллусной культуре картофеля (сорт Надежда) на действие панкреатической ДНКазы. Согласно данным литературы [24], клеточная популяция суспензионной и каллусной культур растительных клеток асинхронна – содержит клетки, различающиеся по времени вхождения в митоз. Для увеличения количества клеток, находящихся в одной стадии развития, течение клеточного цикла блокируется в определенной фазе путем применения соответствующих химических соединений или под влиянием физических факторов – индукторов синхронизации. С помощью индукторов синхронизации в системе *in vitro* получены культуры с митотическим индексом 30–35%. В наших опытах в качестве индуктора син-

хронизации использовали пониженную температуру (+4 °С в течение 72 ч). Фермент вносили на поверхность агаризованной среды. Оценку сырой биомассы проводили через 1 мес. роста культуры. При индукции синхронизации клеточных делений каллуса обнаружено:

1) увеличение роста каллуса в контрольном варианте (фермент не вносился) на 33%, что, по-видимому, связано с увеличением в каллусе количества клеток, одновременно входящих в митоз;

2) появление максимального стимулирующего эффекта ДНКазы при более высокой концентрации фермента, что, по-видимому, также связано с увеличением в каллусе клеток, одновременно входящих в митоз.

Наше предположение находит подтверждение в работе Ф.Г. Куприяновой с сотрудниками [22], в которой показано, что чем больше исходная плотность клеточной взвеси, тем большее количество ферментного препарата (панкреатической ДНКазы) требуется внести в среду культивирования для проявления его стимулирующего влияния на размножение дрожжевых клеток.

Пшеница (сорт Московская-35): проросшие семена пшеницы помещали в раствор ДНКазы определенной концентрации и инкубировали в течение 4-х суток на свету, при комнатной температуре. При концентрации ДНКазы $1 \cdot 10^{-6}$ мг/мл отмечается достоверное увеличение сырой массы корней и надземной части растений (на 17.5 и 7.7% соответственно) относительно контроля.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований показано, что панкреатическая ДНКазы оказывает стимулирующее действие на рост растительных объектов.

Для доказательства того, что стимулирующее действие ДНКазы в наших опытах обусловлено ее ферментативной активностью, были проведены специальные исследования с использованием ДНКазы, предварительно инактивированной прогреванием, на каллусе картофеля (сорт Надежда). Была взята концентрация ДНКазы $1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, которая показала наибольшую стимуляцию роста каллуса. В этом случае достоверных изменений сырой массы каллуса относительно контроля не было обнаружено. При замене инактивированной ДНКазы на бычий сывороточный альбумин в той же концентрации достоверных изменений сырой массы каллуса относительно контроля также не было обнаружено. На основании этих результатов можно предположить, что стимулирующее действие ДНКазы на рост растительных клеток обусловлено ее ферментативной активностью.

Результаты наших исследований по действию ДНКазы на рост быстрорастущего и медленно растущего, а также синхронизированного каллуса дают нам возможность предполагать, что стимулирующее действие ДНКазы на растительные объекты обусловлено ее влиянием на синтез ДНК. Исследованиями сотрудников кафедры микробиологии КГУ показано, что:

1) добавление в культуральную среду ДНКазы стимулирует репликативный синтез ДНК, рост и деление клеток микроорганизмов [25, 26];

2) экзогенные ДНКазы могут индуцировать репликативный синтез ДНК в ядрах покоящихся клеток печени крыс, морского ежа, вьюна [27–31].

Результаты наших исследований по влиянию экзогенной дезоксирибонуклеазы на рост клеток растений представлены в двух публикациях [32, 33].

3. Влияние экстремальных факторов на накопление алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной

При стрессе происходит активация экспрессии генов, кодирующих синтез ферментов, которые катализируют образование защитных соединений, а также наблюдается накопление метаболитов, являющихся предшественниками этих соединений, и активация дыхания, обеспечивающего клетки энергией, необходимой для синтеза этих защитных соединений [47, 48]. Многие авторы [34–36] считают, что одной из функций алкалоидов является защита растений от экстремальных факторов (стрессоров). Поэтому экстремальные факторы значительно повышают продуктивность алкалоидов, выполняющих защитную роль, в культурах клеток, тканей и органов растений, образующих эти соединения. Из этого следует, что воздействием экстремальных факторов можно усилить образование алкалоидов в растительных клетках.

3.1. Свет. Из литературы известно, что свет стимулирует образование вторичных соединений [37, 38]. В качестве экстремального фактора может выступать видимый свет (400–700 нм). Это в тех случаях, когда облучению этим светом подвергаются растительные объекты, которые до этого выращивались в темноте [39]. При этом наблюдалась стимуляция образования алкалоидов в выращиваемых *in vitro* культурах трех видов растений из семейства *Aposynaceae*. Поэтому имеет смысл подбирать определенные условия освещения для увеличения биосинтетической активности культур клеток. Данные о влиянии света на вторичный метаболизм культуры ткани раувольфии змеиной отсутствуют. В связи с этим нами проводилось исследование влияния люминесцентного света на динамику суммы индольных алкалоидов, аймалиновых и резерпиновых алкалоидов, фенолов в гетеротрофной культуре ткани раувольфии змеиной линии А, которая выращивалась в темноте [40, 41].

Установлено, что экспонирование каллуса на свету (3000 люкс) в течение суток в возрасте 50 дней, когда только начинается усиление синтеза алкалоидов, повышало содержание аймалиновых алкалоидов на 63%, а через 13 суток последующего освещения стимуляция снижалась до 10%. В дальнейшем по мере развития культуры эффект стимуляции светом снова начинал расти. Подобный эффект освещения наблюдался и для суммы индольных алкалоидов, а также фенольных соединений. Иная закономерность наблюдается для резерпиновых алкалоидов. Сначала свет незначительно активировал накопление резерпиновых алкалоидов, а затем к 63-м суткам их содержание интенсивно снизилось и в дальнейшем оставалось ниже контроля.

Свет аналогичным образом влиял на каллус и в более поздний период в возрасте 70 дней, когда идет усиленное накопление алкалоидов. Экспонирование каллуса на свету в течение суток в этом возрасте повышало содержание аймалиновых алкалоидов на 59%. Однако освещение в течение последующих 2-х суток ведет к снижению эффекта стимуляции до 47%.

При длительном выращивании на свету (3000 люкс, 14-часовой световой режим в сутках) в течение двух пассажей каллус имел зеленую окраску и выраженный рост. Уровень аймалиновых алкалоидов превосходил значение контрольного варианта на 61% (1-й пассаж) и на 46% (2-й пассаж). В следующих

пассажах значительно снижалось количество аймалиновых алкалоидов в каллусе, а в 6-м пассаже на свету наблюдалась гибель каллуса.

Из полученных данных следует, что свет оказывал существенное влияние на вторичный метаболизм каллуса раувольфии змеиной. Светорегуляция вторичного метаболизма растений представляет собой сложную многофакторную систему [38]. С одной стороны, в хлоропластах на свету с большой скоростью образуются предшественники, источники энергии (АТФ) и восстановители (НАДФ-Н₂), а также происходит (при участии ферредоксин-тиоредоксина) переход в активную форму некоторых специфических хлоропластных ферментов, принимающих участие в биосинтезе вторичных соединений (фенолов, алкалоидов). По этой причине хлоропласты способны служить местом первичного синтеза вторичных веществ. С другой стороны, в растениях функционируют фоторецепторные системы, не связанные с усвоением и накоплением энергии (фитохром, флавопротеин – цитохром b-типа и др.). Наблюдаемая нами при кратковременном воздействии белого света стимуляция образования продуктов вторичного метаболизма в каллусе раувольфии змеиной явно происходит за счет нефотосинтетического действия света, так как культура была гетеротрофной и не содержала хлорофилла. При длительном выращивании культуры ткани на свету, когда формируется фотосинтетический аппарат и каллус приобретает зеленый цвет, не исключается стимуляция биосинтеза алкалоидов и фенолов и фотосинтетическим действием света.

Усиление биосинтеза индольных алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной в ответ на действие света может носить защитный характер. Гетеротрофная культура не способна к адекватному восприятию световой энергии. Пигментной системы нет, и световой поток может повреждать жизненно важные для клетки структуры. Поэтому в этой ситуации свет можно отнести к стрессовым факторам. Это также подтверждается активированием светом рибонуклеазной активности в наших опытах, что, как известно, происходит при стрессе. Кроме того, стресс характеризуется нарастанием процессов, приводящих к образованию свободнорадикальных частиц [42]. Такие частицы могут реагировать с мембранами, с белковыми молекулами, повреждая их. Вторичные метаболиты, представляя собой химически активные соединения, могут связывать свободнорадикальные частицы, тем самым защищая клетку от стрессового воздействия [43].

Интересно, что свет, стимулируя накопление аймалина, снижал содержание резерпиновых алкалоидов. Существует представление, что антистрессовые свойства вторичных метаболитов связаны с наличием у них активных ферментных систем их модификации (окисления-восстановления, гликозидирования-дегликозидирования и др.) [44]. Для аймалина известна такая система (метилирование-деметилование). Поэтому можно предположить антистрессовые функции у аймалина. У резерпина системы модификации не обнаружены. Вероятно, его функции не связаны с ответом клетки на стресс.

Наблюдаемое на свету увеличение фенольных соединений в каллусе раувольфии змеиной согласуется с данными литературы. Физиологическая необходимость в подобном накоплении фенолов при облучении светом гетеротрофных культур, вероятно, заключается в защите биохимического аппарата клетки

от повреждающего действия света. Так, было показано (на примере суспензионной культуры клеток *Rosa damascena*), что, если клетки облучать летальной дозой УФ-света (254 нм) и затем проводить отбор на устойчивость к этому фактору, то будут выживать клетки, способные синтезировать повышенное количество фенольных соединений (таких, как флавоноиды). При этом более устойчивые к облучению светом клетки содержали в 14 раз больше флавоноидов, чем исходные [38].

Исходя из проведенных исследований, можно заключить, что наиболее выгодной для получения аймалиновых алкалоидов является стимуляция их накопления кратковременным освещением (в течение суток) каллуса раувольфии змеиной в период, когда идет усиленный синтез алкалоидов (в возрасте 70 дней).

3.2. Температура. Нами исследовалось влияние повышения температуры до 36 °С на алкалоидообразовательные процессы в каллусе раувольфии змеиной штамма К-27 [40]. Выдерживание 60-дневного каллуса в течение 24 ч при 36 °С повысило содержание аймалиновых алкалоидов на 13% относительно контроля, который выращивался при 26 °С. Но при длительном культивировании каллуса при 36 °С сначала (через 3 сут) наблюдалось исчезновение этого эффекта стимуляции, а затем (через 10 сут) происходило резкое снижение содержания аймалиновых алкалоидов на 52% относительно контроля. Увеличение содержания этих алкалоидов в ответ на 24-часовую экспозицию при 36 °С может быть связано с тем, что температурный оптимум ферментов, катализирующих их образование, наблюдается при значениях, близких к этой температуре, о чем сообщалось в работе Фицнер и др. [45]. Известно также, что при экстремальном повышении температуры нарушается полупроницаемость тонопласта [16]. Вероятнее всего, наблюдаемое уменьшение содержания аймалиновых алкалоидов при продолжительной тепловой обработке связано с этим явлением, в результате чего происходит выход алкалоидов из вакуолей в цитоплазму, где возможна их деградация под действием специфических ферментов, локализованных вне вакуолей. Таким образом, наиболее эффективным для повышения продуктивности штамма К-27 является 24-часовое выдерживание его при 36 °С.

3.3. Абсцизовая кислота. Стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной наблюдалась нами и под влиянием абсцизовой кислоты [40, 46]. Из литературы известно, что одной из неспецифических реакций растительных клеток, испытывающих влияние любого стресса, является образование стрессовых гормонов: абсцизовой и жасмоновой кислот и этилена, которые, в свою очередь, индуцируют или активируют образование защитных веществ [47–49]. К сожалению, в литературе мало сведений о действии этих гормонов на образование алкалоидов. Поэтому для изучения неспецифического влияния экстремальных факторов на образование алкалоидов в разных штаммах культуры ткани раувольфии змеиной мы исследовали действие на них абсцизовой кислоты. На поверхность питательной среды с 47-дневным каллусом линии А вносили растворы абсцизовой кислоты разных концентраций и продолжали культивировать в течение 25 дней. При увеличении концентрации

абсцисовой кислоты количество аймалиновых алкалоидов возрастало (до 80%) на фоне снижения эффекта стимуляции образования общего количества индольных алкалоидов от 48% до 13%, что свидетельствует о важной роли аймалиновых алкалоидов в адаптации клеток к экстремальным факторам. Это же следует и из другого опыта, где абсцисовая кислота вносилась в концентрации 1.5 мг/мл на поверхность питательной среды в возрасте каллуса 60 дней. В этом случае с увеличением времени воздействия (от 1 до 14 дней) стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов в каллусе линии А возрастала от 28 до 47%, а общего количества индольных алкалоидов от 17% до 27%. Абсцисовая кислота стимулировала образование аймалиновых алкалоидов почти в 2 раза больше, чем накопление общего количества индольных алкалоидов в соответствующие сроки. Сходным образом действовала абсцисовая кислота и на каллус штамма К-27, но эффект стимуляции в этом случае был в значительно меньшей степени. Это свидетельствует о меньшей чувствительности более продуктивного штамма К-27 к неспецифическому действию стрессоров. Стимулирующее влияние абсцисовой кислоты на накопление аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной, по-видимому, можно объяснить тем, что при действии этого гормона в высоких концентрациях усиливается распад белков [50], а это приводит к накоплению входящего в их состав триптофана, который является предшественником этих алкалоидов и одновременно оказывает регуляторное действие на их биосинтез [36].

Абсцисовая кислота может быть рекомендована для практического применения с целью стимуляции накопления аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной.

3.4. Инфицирование. Стимулировать накопление алкалоидов в растительной клетке можно также с помощью воздействия такого экстремального фактора, как инфицирование фитопатогенным грибом *Botrytis cynerea* [46]. В отношении алкалоидов и других веществ специализированного обмена выявлено, что из всех исследованных экстремальных факторов наибольшую стимуляцию образования этих соединений вызывает обработка культивируемых клеток растений элиситорами [51, 52]. При этом удается достичь 10–100-кратного увеличения продукции алкалоидов. Как правило, в качестве элиситоров, то есть специфических индукторов ферментов, катализирующих образование веществ специализированного обмена, использовался гомогенат из грибного мицелия или какие-либо другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Для вакцинации *in vitro* практически всегда использовались гомогенаты или экстракты из широкоспециализированных патогенов (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Pythium* и др.). Это, по-видимому, связано с тем, что эти грибы не требовательны к составу питательной среды, что позволяет выращивать их для получения вакцин на очень дешевых средах. В ответ на вакцинацию в подавляющем большинстве случаев наблюдалось усиление синтеза не всех, а лишь отдельных алкалоидов или их групп, преимущественно тех, которые являются биологически значимыми в реализации защитной реакции от воздействия патогенов. Кроме того, стимуляция образования отдельных алкалоидов может быть значительной на фоне незначительной стимуляции образования других алкалоидов [52].

Механизм действия вакцин на активацию биосинтеза индольных алкалоидов в *Catharanthus roseus* состоит в увеличении содержания в клетках транскриптов триптофандекарбоксилазы и стриктозидинсинтазы и, возможно, других ферментов, катализирующих образование этих алкалоидов [36]. Поскольку первые два фермента участвуют также в биосинтезе всех индольных алкалоидов в раувольфии змеиной, то применение вакцинации может быть чрезвычайно перспективным и для повышения накопления аймалиновых алкалоидов в ее культурах *in vitro*.

Нами на поверхность каллуса раувольфии змеиной линии А на 60-й день культивирования наносился 1 мл дистиллированной воды, содержащей споры *Botrytis cinerea*, в контроле – 1 мл дистиллированной воды. Уже через сутки после инфицирования каллуса эффект стимуляции образования аймалиновых алкалоидов составлял 57%, что намного (в 1.5–2 раза) больше соответствующих эффектов от влияния других экстремальных факторов на линию А в возрасте 60 дней (28–38%). Отсюда следует, что эти алкалоиды особо важны для раувольфии при нападении на нее патогенов, что указывает на фитонцидную роль этих соединений. Общее количество индольных алкалоидов через сутки после инфицирования каллусов выросло на 32%, что в 1.8 раза меньше эффекта стимуляции образования общего количества алкалоидов от влияния других экстремальных факторов на линию А в том же возрасте (18–26%). Это может быть связано с увеличением числа алкалоидов, являющихся предшественниками аймалина, или с тем, что и другие индольные алкалоиды раувольфии участвуют в защите клеток этого растения от повреждений его патогенами.

Более интересная картина наблюдалась при изменении содержания алкалоидов в отдельных частях каллуса после инфицирования, при этом наибольший эффект стимуляции образования как аймалиновых алкалоидов (200%), так и общего количества алкалоидов (78%) обнаруживался во внешней части каллуса. В нижней части каллуса, которая в меньшей степени контактировала с патогеном, наблюдалось меньшее увеличение количества аймалиновых алкалоидов (120%) и общего количества алкалоидов (63%). Во внутренней части каллуса не было достоверного изменения количества алкалоидов. Таким образом, резкое увеличение содержания аймалиновых алкалоидов в поверхностных клетках, непосредственно контактирующих с патогеном, указывает на то, что эти соединения создают барьер для дальнейшего распространения инфекции. Поскольку фитонцидами также являются стриктозидин и, возможно, другие алкалоиды раувольфии змеиной, то резкое увеличение общего количества алкалоидов в контактирующих с патогеном клетках, может быть обусловлено возрастанием доли этих антимикробных соединений. В пользу этого свидетельствует то, что увеличение общего количества алкалоидов во внешней и нижней частях каллуса только на 35–44% обусловлено увеличением содержания аймалиновых алкалоидов.

Эффекты стимуляции образования алкалоидов, наблюдаемые через сутки после инфицирования каллуса, исчезают через трое суток не только в целом каллусе, но и во внешних и нижних частях каллуса. Во внешней части каллуса даже происходит снижение содержания аймалиновых алкалоидов на 14% от неинфицированного контроля. Это объясняется тем, что после выхода алка-

лоидов из вакуолей при инфицировании они становятся доступными для ферментов их деградации, локализованных вне вакуолей.

Полученные данные позволяют сделать вывод о фитонцидной роли аймалиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной. В связи с этим следует ожидать, что для повышения накопления аймалиновых алкалоидов перспективным приемом может стать вакцинация культуры тканей раувольфии змеиной убитыми фитопатогенными микроорганизмами.

3.5. Ориентация в гравитационном поле Земли. Нами также исследовалось влияние на накопление аймалиновых алкалоидов в штамме К-27 такого необычного и не описанного ранее в литературе приема, как переворачивание культуральных сосудов с 60-дневными каллусами этого штамма на 180°, то есть сверху дном [40]. Поскольку все растительные клетки и организмы развиваются в гравитационном поле Земли, а при переворачивании происходит резкое отклонение от нормальной ориентации каллусов в этом поле, то переворачивание следует рассматривать как экстремальный фактор.

Уже через сутки после переворачивания усиливалось образование аймалиновых алкалоидов на 12%. В то же время не было достоверного увеличения общего количества индольных алкалоидов. Стимулирующее влияние стрессора на образование аймалиновых алкалоидов, по-видимому, обусловлено ориентированным транспортом ионов Ca^{2+} , что наблюдается при гравитропических реакциях [53–55]. А ионы Ca^{2+} , как уже отмечалось ранее [17], играют решающую роль в образовании алкалоидов раувольфии. При этом Ca^{2+} может активировать ферменты биосинтеза алкалоидов и/или ингибировать процессы их расщепления. Кроме того, стимуляция образования алкалоидов при переворачивании может быть связана с более поздним по времени образованием абсцизовой кислоты, что также характерно для гравитропических реакций.

Необходимо отметить, что исследованные нами экстремальные факторы окружающей среды, как правило, существенно повышали образование аймалиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной, находящейся в стационарной фазе роста (в возрасте 60 дней и более). Из этого можно предположить, что аймалиновые алкалоиды являются стрессовыми метаболитами.

Освещение культуры ткани раувольфии змеиной, инфицирование, обработка растворами абсцизовой кислоты можно отнести к экспресс-методам увеличения аймалиновых алкалоидов, так как уже через сутки после их воздействия проявляется значительный стимулирующий эффект. Эти факторы могут быть рекомендованы для практического применения с целью стимуляции накопления аймалиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной.

4. Влияние некоторых элементов минерального питания на рост и накопление алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной

4.1. Селен. В литературе все больше накапливается данных о том, что селен является незаменимым микроэлементом для человека и животных: недостаток этого элемента в питании может влиять на возникновение и развитие кардиологических и онкологических заболеваний [56, с. 196–231; 57]. Что касается растений, то до сегодняшнего времени селен признавали «условно эс-

сенциальным» или вообще отрицали его необходимость в растительном мире. В последнее время в литературе появились сведения о положительном влиянии селена в низких концентрациях на рост и развитие растений, продуцирование биологически активных соединений, а также на адаптационный потенциал у растений [58–65]. Несмотря на факты положительного влияния селена на растения, необходимость его для растительных объектов до сих пор подвергается сомнению. Данных по влиянию селена на культуру ткани растений нами не найдено.

Проведенные нами исследования показали, что внесение селенита натрия в среду культивирования существенно влияет на прирост биомассы культуры ткани раувольфии змеиной. Наибольшая стимуляция прироста сырой биомассы наблюдалась при концентрации селенита натрия 10^{-1} мг/л (55.5%). Такая же закономерность сохранялась и для воздушно-сухого веса, эффект стимуляции при данной концентрации – 33%.

Максимальное содержание аймалиновых алкалоидов в каллусе наблюдалось при той же концентрации селенита натрия (10^{-1} мг/л), эффект стимуляции – 28%.

В проведенном нами опыте варианты с различным способом внесения селенита натрия в среду (до и после автоклавирования) не дали достоверной разницы в исследованных показателях. Из этого следует, что селенит натрия можно вносить в питательную среду до автоклавирования.

Установлено, что пассирование каллуса с селенитом натрия в оптимальной концентрации стимулировало накопление аймалиновых алкалоидов с 1-го по 5-й пассаж. Дальнейшее пассирование на среде с селенитом натрия в 6-м и 7-м пассажах не влияло на содержание алкалоидов, а в 8-м пассаже наблюдалось значительное снижение количества алкалоидов. По-видимому, при длительном пассировании каллуса на среде с селеном происходило его накопление в клетках до ингибирующей концентрации. В работе Н.А. Прониной и др. [61] показано, что содержание селена в клетках спирулины находилось в прямой зависимости от концентрации селенита в среде, что свидетельствует о неспособности клеток лимитировать его накопление. Поэтому при использовании селена для стимуляции накопления аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной не имеет смысла длительно пассировать его на среде с селенитом натрия.

Стимулирующее влияние селена на рост культуры ткани раувольфии змеиной можно, по-видимому, объяснить тем, что он участвует в антиоксидантной системе растительных клеток [66]. Дыхание и окислительно-восстановительные процессы в клетке дают большие преимущества всем живым организмам, в том числе и растениям. Однако при метаболизме кислорода в клетках образуется очень реакционноспособные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК). Образование АФК наблюдается также при действии различных стрессовых факторов: действии низких температур [63], повреждении ультрафиолетовым светом, изменении режимов увлажнения, засоления [67].

Известно, что клетки в культуре подвержены осмотическому стрессу вследствие высокого содержания в среде сахаров и повышенных концентраций минеральных солей [68]. Осмотический стресс несомненно сказывается на ростовой функции каллусных клеток.

Доказано, что в относительно низких концентрациях АФК играют роль сигнальных медиаторов и вызывают синтез защитных белков [69]. Однако, как указывают некоторые авторы, превышение стационарного уровня АФК приводит к иницированию перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) [70]. ПОЛ – это цепные реакции, которые приводят к повреждению и разрушению биологических мембран в клетке. Перекисные соединения, формирующиеся в процессе ПОЛ, представляют собой супероксидный анион (O_2^-), перекись водорода, гидроксильный радикал (OH^\bullet) и синглетный кислород (O_2^\bullet). Данные соединения отличаются между собой как по стабильности молекул, так и по способности индуцировать повреждения в клетке.

Главную роль в защите растительных клеток от свободных радикалов играет супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза, каталаза и др. СОД катализирует превращение супероксидных и пероксидных радикалов до перекиси водорода, после чего в работу включаются другие ферменты антиоксидантной системы.

Глутатионпероксидаза, которая является селенсодержащим ферментом, редуцирует перекись водорода до воды путем окисления глутатиона. Включаясь в активный центр фермента, селен стимулирует процесс элиминирования H_2O_2 . Известно, что глутатион-пероксидаза действует совместно с селензависимой глутатион-редуктазой, которая восстанавливает окисленный глутатион, а также участвует в восстановлении селенита до селенистого водорода и включении его в органические соединения [71]. Интересно, что микроэлемент в селенопротеины входит в основном в состав селен-цистеина (Se-Cys), который присоединяется к полипептидной цепочке во время трансляции стопкодона UGA. Транспорт аминокислоты обеспечивается уникальной Se-Cys-тРНК [72]. Таким образом, селен способствует сохранению ПОЛ на определенном уровне, что, в свою очередь, положительно влияет на рост культуры ткани раувольфии змеиной. Из литературы известно, что селен в высоких концентрациях угнетает рост растений. Это происходит потому, что: 1) такие концентрации селена действуют на клетку как прооксидант [73], 2) активное включение селена в органические соединения приводит к ингибированию основных метаболических процессов в клетке [74]. Селен может частично заменять серу, особенно при ее низких концентрациях в среде [60, 61], поскольку они близки по свойствам. Так, Т.С. Жильцова с сотр. [75] сообщает о включении до 70% селена, усвоенного дрожжевыми клетками, в белковую и аминокислотную фракции. Но функции серосодержащих аминокислот и их селен-аналогов не эквивалентны [76]. Видимо, по этой причине происходит нарушение функционирования белков, что может привести к угнетению роста. Поскольку мы не исследовали активность перечисленных выше ферментов, хотелось бы отметить работы В.П. Комова с сотр. [66], которые были проведены на культуре ткани раувольфии змеиной штамм К-27. Показано, что уровень активности СОД коррелирует с митотической активностью культивируемых клеток и максимальным приростом биомассы. Первый максимум активности СОД приходится на 10–15-е сутки, а второй – на 35–40-е сутки культивирования, то есть во время активного деления диплоидных и тетраплоидных клеток соответственно. Видимо, митотическая актив-

ность клеток, сопровождаемая интенсивным дыханием, приводит к повышению уровня АФК, что и объясняет усиление активности СОД.

Механизм воздействия селена на синтез аймалиновых алкалоидов для нас пока не ясен. В литературе нет данных о влиянии селена на образование алкалоидов. Имеются только некоторые сведения об усилении синтеза биологически активных веществ под действием селена [59]. Возможно, для синтеза аймалиновых алкалоидов нужен определенный уровень АФК, который обеспечивается стимулирующими концентрациями селена благодаря участию его в действии таких ферментов, как селен-содержащая глутатионпероксидаза и селен-зависимая глутатионредуктаза. Выше отмечалось, что в относительно низких концентрациях АФК играют значительную роль сигнальных медиаторов и вызывают синтез защитных белков [69]. А возможно, вызывают и синтез аймалиновых алкалоидов, которые являются антистрессовыми метаболитами, что доказывается результатами наших исследований, приведенных в разделе «Влияние экстремальных факторов на накопление алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной». К тому же надо заметить, что клетки в культуре подвержены осмотическому стрессу, как уже отмечалось [68].

Таким образом, данные наших опытов показывают, что селен оказал положительное влияние на рост культуры ткани раувольфии змеиной и накопление в ней аймалиновых алкалоидов.

4.2. Ванадий. В большей части исследований показано, что ванадий представляет собой стимулятор роста растений лишь при применении его в определенной концентрации. Высокие концентрации ванадия оказались токсичными для растений [77]. Установлено, что сульфат ванадия способствовал сокращению периода роста и увеличению почти в 2 раза содержания индольных алкалоидов аймалицина и катарантина в культивируемых клетках катарантуса розового [78, 79]. Влияние сульфата ванадия на содержание алкалоидов зависит от штамма культуры, времени внесения и концентрации. Поскольку аймалиновые алкалоиды относятся к индольным, то имело смысл исследовать влияние ванадия на накопление аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной.

В наших экспериментах на поверхность каллуса в возрасте 45 суток (стационарная фаза роста, когда начинается усиление синтеза алкалоидов) вносились 3 мл раствора сульфата ванадия в возрастающих концентрациях от 20 до 100 мг/л. Через 15 суток после внесения сульфата ванадия на 60-е сутки культивирования наблюдалась некоторая тенденция к увеличению содержания аймалиновых алкалоидов при концентрации 100 мг/л. Через 25 суток после внесения сульфата ванадия на 70-е сутки культивирования происходило увеличение эффекта стимуляции до 29% по мере возрастания концентрации.

Значительный эффект стимуляции содержания аймалиновых алкалоидов до 69% отмечался при обработке сульфатом ванадия в концентрации 100 мг/л каллуса, выращенного на среде с мелафеном в концентрации 10^{-3} г/л.

Однако добавление сульфата ванадия в питательную среду перед посевом уменьшало количество аймалиновых алкалоидов в каллусе на 70-е сутки культивирования. Содержание алкалоидов снижалось до 75% относительно контроля с повышением концентрации сульфата ванадия от 0.01 до 50 мг/л среды.

Концентрация 50 мг/л привела к частичной гибели каллуса, а концентрация 100 мг/л – к полной гибели. Исследованные концентрации сульфата ванадия в этих условиях оказались токсичными. Хотя концентрации от 20 до 100 мг/л при обработке поверхности каллуса в стационарную фазу вызывали стимуляцию накопления алкалоидов, как отмечалось выше. Это свидетельствует о том, что влияние сульфата ванадия на содержание аймалиновых алкалоидов в каллусе раувольфии змеиной зависит от его концентрации, возраста культуры, способа внесения и продолжительности действия. Аналогичное подавление до 85% накопления суммы индольных алкалоидов в проростках катарантуса розового наблюдалось при всех исследованных концентрациях раствора ванадата натрия (от 0.01 до 100 мМ) в работах М.Я. Ловковой с соавт. [80].

В настоящее время не известен механизм воздействия ванадия на синтез вторичных соединений, но имеются сведения, что ванадий стимулирует реакции переноса электронов в окислительных реакциях [81]. Можно предположить, что ванадий способен участвовать в активации переноса электронов в окислительных реакциях и на некоторых стадиях синтеза аймалина, что способствует стимуляции его образования.

Кроме того, Г.Б. Бузук и М.Я. Ловкова в обзоре [52], посвященном метаболизму алкалоидов, отмечают, что высокие концентрации тяжелых металлов, в том числе и ванадия, могут служить в качестве абиотических элиситоров – веществ, специфически индуцирующих ферменты вторичного метаболизма.

4.3. Кальций. В работе И.Е. Кауховой с сотр. [18] на каллусной культуре ткани раувольфии змеиной (штамм К-27) показана противоположная зависимость потребления ионов калия и кальция клетками. В первые 28–30 суток наблюдалось интенсивное потребление из питательной среды калия и незначительное – кальция. В дальнейшем отмечено вымывание калия из клеток и интенсивное поглощение кальция (после 35 суток). Именно в первые 30–35 суток культивирования наблюдается интенсивное деление клеток и накопление биомассы, в последующий период уровень деления клеток снижается и начинается интенсивный синтез алкалоидов. Таким образом, установлена связь потребления калия и кальция клетками ткани раувольфии змеиной с ее продуктивностью. Авторы считают, что это дает возможность регулировать процесс накопления биомассы раувольфии змеиной и содержания в ней алкалоидов путем изменения концентрации этих элементов в питательной среде.

Имеются также данные, что стимулирующее действие антистрессового гормона цитокинина на синтез алкалоидов связано с увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция [17]. Поэтому особый интерес представляет исследование влияния кальция на образование алкалоидов раувольфии змеиной в период их накопления. В наших опытах на поверхность каллуса в возрасте 60 и 70 суток вносилось 3 мл раствора нитрата кальция в концентрациях 0.9 (исходная концентрация в питательной среде) и 1.8 г/л. Дополнительное внесение кальция оказывало наибольший эффект на содержание аймалиновых алкалоидов через сутки после обработки 70-дневных каллусов. Оптимальной концентрацией оказалась 1.8 г/л, при которой эффект стимуляции составлял 33%. Более кратковременная экспозиция с нитратом кальция (3 ч) при этих

же условиях увеличивала количество аймалиновых алкалоидов на 15% по сравнению с контролем. При внесении нитрата кальция на 60-е сутки культивирования эффекта стимуляции накопления аймалиновых алкалоидов не наблюдалось. Возможно, это связано с тем, что культура в это время еще не нуждалась в дополнительных ресурсах кальция, достаточно было того количества, которое было в среде. А к 70-м суткам, когда идет наибольшее накопление алкалоидов и усиленное поглощение кальция, по-видимому, уже наблюдается истощение среды. И дополнительное внесение нитрата кальция должно вызвать стимуляцию, что и наблюдалось.

Для проверки действительности влияния кальция, а не нитрата на увеличение содержания алкалоидов, был поставлен специальный опыт, где использовался нитрат кальция (1.8 г/л) и нитрат калия (2.215 г/л) в концентрациях, выровненных по нитрату. Дополнительное внесение нитрата калия при экспозиции 24 ч не оказывало значительного действия на накопление аймалиновых алкалоидов в 70-дневном каллусе (стимуляция 8%). Внесение же нитрата кальция давало эффект стимуляции 37%. Полученные данные согласуются с представлением, что ионы кальция играют решающую роль в накоплении алкалоидов в растительных клетках, участвуя в активировании ферментов биосинтеза алкалоидов и ингибировании процессов их расщепления [17].

4.4. Цинк. В наших опытах обработка культуры ткани раувольфии змеиной в стационарной фазе роста (70 суток) 3 мл раствора сульфата цинка в концентрации 8.6 мг/л (как в среде культивирования) в течение 1 ч увеличивала содержание аймалиновых алкалоидов почти в 2 раза.

Полученные результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе. В работе М.Я. Ловковой и др. [30] исследовалось влияние возрастающих концентраций цинка (хлорид цинка) на образование и накопление суммы индольных алкалоидов в проростках катарантуса розового. Зависимость эффекта от концентрации носила колоколообразный характер. Оптимальной для продукции алкалоидов была концентрация элемента 0.1 мМ, при которой стимуляция составляла 38%, хотя выраженный стимулирующий эффект на продукцию алкалоидов проявлялся в широком диапазоне концентраций (от 0.001 до 1 мМ).

Наиболее вероятный механизм стимуляции накопления индольных алкалоидов связан с активированием цинком биосинтеза одного из предшественников индольных алкалоидов триптофана. Данные о положительном влиянии цинка на биосинтез триптофана получены на многих объектах. Увеличение биосинтеза триптофана связывают с активированием этим элементом триптофансинтетазы. Помимо стимуляции синтеза одного из предшественников индольных алкалоидов в основе влияния цинка могут лежать и другие механизмы. Действие цинка на биосинтез индольных алкалоидов может быть опосредовано через влияние этого элемента на синтез ростовых веществ, в частности ауксинов. В ферментной системе биосинтеза ауксинов цинку отводится роль необходимого и специфического кофактора [83].

5. Удешевление питательной среды для выращивания каллуса раувольфии змеиной

Состав сред, используемых в настоящее время для культивирования растительных клеток, довольно сложен. В связи с этим определенный практический интерес имеют работы, направленные на удешевление питательной среды для выращивания изолированных клеток растений.

5.1. Замена агара на фитагель. Перспективным для получения аймалина из каллуса раувольфии змеиной является замена агара на фитагель в среде выращивания. Фитагель является гелеобразователем, в состав которого входит Д-галактуроновая кислота. В наших опытах [46] использовался агар и фитагель фирмы «Sigma». Концентрация агара в среде была 7.5 г/л, а фитагеля – 2 г/л. Замена агара на фитагель привела к значительной и стабильной стимуляции образования аймалиновых алкалоидов в каллусе штамма К-27. По мере пассирования каллуса на среде с фитагелем наблюдалась тенденция к увеличению стимуляции (к 12-му пассажу эффект стимуляции достигал 124%). Вероятно, одной из причин этого может быть элиситирующее действие галактуроновой кислоты. Известно, что галактуроновая кислота входит в состав элиситоров, образующихся в результате распада клеточных стенок при инфицировании и индуцирующих синтез защитных веществ. Есть сведения о стимулирующем влиянии на рост каллусов олигогалактуронидов, то есть олигосахаридов, полученных при гидролизе пектиновых веществ [82]. Использование фитагеля в качестве заменителя агара экономически целесообразно, так как при их почти одинаковой стоимости расход фитагеля в 3.75 раза меньше, при этом происходит стабильная и ощутимая стимуляция биосинтеза аймалиновых алкалоидов.

5.2. Замена сахарозы на рафинированный пищевой сахар. Одним из дорогостоящих компонентов питательной среды, используемой для выращивания культуры ткани раувольфии змеиной, является сахароза. В среде для линии А содержание сахарозы 6%, а для штамма К-27 – 10%. Специальные исследования, проведенные нами на штамме К-27 в 1992 г., показали, что сахароза в среде для культивирования может быть заменена на обычный пищевой рафинированный сахар [83]. При этом не изменяется прирост биомассы и накопление алкалоидов. С тех пор по настоящее время культура ткани раувольфии змеиной успешно выращивается нами на среде с рафинированным сахаром. Такая замена с экономической точки зрения выгодна, так как сахароза в 10 раз дороже пищевого сахара.

6. Методические разработки

Одним из соавторов статьи [10] А.В. Куниным была разработана методика определения количества резерпиновых алкалоидов, а методики определения суммы индольных алкалоидов и фенолов были им модифицированы.

Заключение

Обнаружена стимуляция роста культуры ткани раувольфии змеиной под действием биназы, панкреатической дезоксирибонуклеазы, селена. Стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов в этой культуре наблюдалась под действием биназы, света, абсцизовой кислоты, инфицирования, фитагеля, селена, ванадия, кальция и цинка.

Разработаны приемы воздействия этих факторов, обеспечивающих стимуляцию. Для усиления накопления биомассы указанные вещества необходимо вносить в питательную среду или на поверхность агаризованной среды при посеве. Для увеличения содержания алкалоидов в каллусе исследованными факторами надо воздействовать в стационарную фазу роста, когда начинался усиленный синтез алкалоидов. Под влиянием экстремальных факторов (света, абсцизовой кислоты, повышенной температуры) происходила стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов, что указывает на их антистрессовую функцию. Особенно большой эффект стимуляции накопления аймалиновых алкалоидов наблюдался при действии на каллус такого экстремального фактора, как инфицирование спорами *Botrytis cinerea*, в 1.5–2 раза больше соответствующих эффектов от влияния других экстремальных факторов. При этом наибольший эффект стимуляции (200%) обнаружен во внешней части каллуса, которая непосредственно контактировала с патогеном. Это свидетельствует о фитонцидной роли аймалиновых алкалоидов. Приведены возможные механизмы действия указанных факторов.

Освещение каллуса раувольфии змеиной, инфицирование, обработка растворами абсцизовой кислоты, нитрата кальция и сульфата цинка можно отнести к экспресс-методам увеличения аймалиновых алкалоидов, так как уже через 1 сутки, а в случае сульфата цинка даже через 1 ч, после воздействия проявляется значительный стимулирующий эффект.

Таким образом, исследованные факторы можно рекомендовать для стимуляции накопления биомассы и аймалиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной.

В исследовании принимали участие студенты А.В. Кунин, Р.И. Чечеткин и Г.Н. Марданова, которые за активную научно-исследовательскую работу были удостоены стипендии имени В.А. Энгельгардта.

Summary

N.S. Siyanova, S.N. Neustrueva. Optimization of Cultural Conditions for the Tissue Culture of *Rauwolfia serpentina* Benth.

The influence of various environmental factors on the growth and the alkaloid accumulation in *Rauwolfia serpentina* Benth. callus has been investigated. It was shown that the stimulation of ajmaline alkaloid formation was at action of *Bacillus intermedius* ribonuclease, light, abscisic acid, infection by fungus *Botrytis cinerea*, phytigel and various elements (Se, V, Ca, Zn). These factors may be recommended for practical application with the purpose of increasing the amount of ajmaline alkaloid in the tissue culture of *Rauwolfia serpentina*.

Key words: biotechnology, *Rauwolfia serpentina* Benth., callus growth stimulation, alkaloids.

Литература

1. Воллосович Н.Е., Воллосович А.Г., Ковалева Т.А. Штаммы культуры *Rauwolfia serpentina* Benth и их продуктивность // Раст. ресурсы. – 1976. – Т. 12, Вып. 4. – С. 578–583.
2. Воллосович А.Г., Пучинина Т.Н., Николаева Н.А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. Сообщение 1 // Раст. ресурсы. – 1979. – Т. 15, Вып. 4. – С. 516–526.
3. Воллосович А.Г., Пучинина Т.Н., Листунова Н.А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. Сообщение 3 // Раст. ресурсы. – 1982. – Т. 18, Вып. 2. – С. 239–243.
4. Солдатова Н.Г., Беляева М.И. Действие нуклеазы *Serratia marcescens* на кишечную палочку // Некоторые подходы к изучению биологической роли нуклеаз: Сб. ст. / Науч. ред. М. И. Беляева. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1972. – С. 53–61.
5. Егоров С.Ю., Куприянова Ф.Г., Колпаков А.И., Стимуляция размножения бактерий экзогенными РНКазы // Тез. докл. межреспубл. совещ. «Нуклеазы микроорганизмов и их практическое применение». – Рига, 1989. – С. 50.
6. Куприянова-Аишина Ф.Г., Колпаков А.И., Егоров С.Ю. Влияние РНКазы *Bacillus intermedius* на размножение дрожжей *Candida tropicalis* // Биол. науки. – 1992. – № 4 (340). – С. 90–100.
7. Гараева Р.Г., Хохлова Л.П., Явишев Б.Г., Артемьева Г.М. Влияние бактериальной рибонуклеазы на продуктивность ярового ячменя, озимой пшеницы, гречихи и цитогенетическая активность ферментного препарата // Биол. науки. – 1992. – № 2 (338). – С. 121–127.
8. Сиянова Н.С., Жегалова И.В., Неуструева С.Н., Куприянов-Ашин Э.Г. Влияние бионазы на рост и продуктивность культуры ткани раувольфии змеиной. – Казань, 1992. – 13 с. – Деп. в ВИНТИ 30.12.92, № 3718-В-92.
9. Жегалова И.В., Сиянова Н.С., Неуструева С.Н., Винтер В.Г. Стимуляция рибонуклеазой *Bacillus intermedius* роста и накопления индольных алкалоидов в каллусной культуре *Rauwolfia serpentina* Benth // Раст. ресурсы. – 1995. – Т. 31, Вып. 2. – С. 44–49.
10. Неуструева С.Н., Кунин А.В., Сиянова Н.С., Жегалова И.В., Винтер В.Г., Марданова Г.Н. Влияние бионазы на динамику основных метаболических процессов в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 149–160.
11. Колпаков А.И., Крылова Н.И., Куприянова Ф.Г. Влияние экзогенной РНКазы на накопление биомассы и эффективность роста дрожжей рода *Candida* // Тез. докл. межреспубл. совещ. «Нуклеазы микроорганизмов и их практическое применение». – Рига, 1989. – С. 51–52.
12. Запромётов М.Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, Вып. 6. – С. 921–931.
13. Полевой В.В. Фитогормоны. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 248 с.
14. Лецинская И.Б., Варламов В.П., Куриненко Б.М. Нуклеазы бактерий. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1991. – 232 с.
15. Колпаков А.И., Куприянова-Аишина Ф.Г. Биохимические аспекты стимулирующего действия экзогенных РНКаз // Биол. науки. – 1992. – № 2 (338). – С. 103–107.
16. Полевой В.В. Физиология растений. – М.: Высш. шк., 1989. – 464 с.
17. Merril J.-M., Liu D., Huguet F. et al. Effects of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on cytokinin – enhanced alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures // Plant Physiol. Biochem. – 1991. – V. 29, No 3. – P. 289–296.

18. Каухова И.Е., Титов В.Е., Куклин А.И., Соколова Л.П., Ибрагимова Э.Д. О потреблении ионов калия и кальция клетками культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth // Раст. ресурсы. – 1992. – Т. 28, Вып. 4. – С. 70–73.
19. Беляева М.И., Куприянова Ф.Г., Куриненко Б.М. Влияние панкреатической дезоксирибонуклеазы на размножение *E. coli* // Микробиол. – 1976. – Т. 45, Вып. 5. – С. 917–919.
20. Беляева М.И., Куприянова Ф.Г., Ульянова М.Н. Влияние нуклеазы *Serratia marcescens* на размножение *Candida tropicalis* // Микробиол. – 1977. – Т. 46, Вып. 2. – С. 300–303.
21. Куприянова Ф.Г., Решетник О.А., Хайрутдинова С.А., Винтер В.Г. Влияние экзогенных нуклеополимераз на размножение *Bacillus subtilis* // Микробиол. – 1979. – Т. 48, Вып. 2. – С. 249–255.
22. Куприянова Ф.Г., Давыдова М.Н., Кузнецова Н.Н., Винтер В.Г. Стимуляция размножения дрожжей *Candida tropicalis* экзогенными нуклеазами // Биол. науки. – 1982. – № 10. – С. 91–95.
23. Куприянова Ф.Г. Влияние экзогенных дезоксирибонуклеаз на синтез ДНК, рост и деление микроорганизмов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1991. – 47 с.
24. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.
25. Куприянова Ф.Г., Решетник О.А., Соيفер В.Н., Винтер В.Г. Влияние панкреатической ДНКазы на синтез ДНК *Bacillus subtilis* // Биохимия. – 1979. – Т. 44, Вып. 2. – С. 332–337.
26. Куприянова Ф.Г., Кашапов Р.И., Винтер В.Г. Инициация репликации ДНК *Bacillus subtilis* экзогенными ДНКазми // Микробиол. – 1981. – Т. 50, Вып. 3. – С. 437–441.
27. Винтер В.Г., Зоткина Н.Л., Гайнуллина Ф.Г. Изучение механизма действия дезоксирибонуклеазы хроматина печени крыс на ДНК // Биохимия. – 1976. – Т. 41, Вып. 1. – С. 119–123.
28. Винтер В.Г., Хамидуллина Н.Г., Абрамова З.И., Шумилов Ю.Н., Рассказов В.А. Влияние Ca^{2+} -, Mg^{2+} -зависимой ДНКазы на синтез ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа // Биохимия. – 1987. – Т. 52, Вып. 12. – С. 2009–2014.
29. Винтер В.Г., Аскаророва А.Н., Зоткина Н.Л., Хамидуллина Н.Г., Шлянкевич М.А., Дризе О.В. Стимуляция синтеза ДНК в изолированных ядрах печени крыс нейтральной Mn -зависимой ДНКазой хроматина // Биохимия. – 1988. – Т. 53, Вып. 11. – С. 1906–1911.
30. Винтер В.Г., Абрамова З.И., Шумилов Ю.Н., Рассказов В.А., Котляр Е.Ю., Хамидуллина Н.Г. Сравнительное изучение действия различных ДНКаз на синтез ДНК в изолированных ядрах морского ежа. – Казань, 1988. – 18 с. – Деп. в ВИНТИ 16.11.88, № 8157-B88.
31. Котляр Е.Ю. Дезоксирибонуклеазы эмбрионов морского ежа и вьюна и участие их в репликации ДНК: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 1990. – 22 с.
32. Сиянова Н.С., Неуструева С.Н., Винтер В.Г. Влияние ДНКазы на рост культуры тканей картофеля // Тез. докл. науч.-произв. совещ. «Селекционно-генетические, физиолого-биохимические и технологические аспекты интенсификации производства картофеля». – Уфа, 1988. – С. 33–35.
33. Винтер В.Г., Сиянова Н.С., Неуструева С.Н., Жегалова И.В., Чечёткин И.Р. Влияние экзогенной дезоксирибонуклеазы на рост клеток растений // Новая геометрия природы. Тр. объед. междунар. конф. 25 авг. – 3 сент. 2003 г. Т. II. Биология. Медицина. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2003. – С. 374–376.

34. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов *in vivo* и *in vitro* // Физиол. раст. – 1994. – Т. 41, Вып. 6. – С. 873–878.
35. Рощина В.Д., Рощина В.В. Выделительные функции высших растений. – М.: Наука, 1989. – 214 с.
36. Kutchan T.M. Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants // Plant Cell. – 1995. – V. 7, No 7. – P. 1059–1070.
37. Gricebach H., Nahibrok K. Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plant and plant cell suspension cultures // Metabolism and regulation of secondary plant products. – N. Y.: Academic Press, 1987. – P. 21–52.
38. Запромётов М.Н. Светорегуляция вторичного метаболизма растений // Физиол. раст. – 1987. – Т. 34, Вып. 4. – С. 698–711.
39. Partridge J.E. Introductory Plant Pathology. Section 7. Environmental Effects on the Pathodeme and Plant Disease. – Lincoln: University of Nebraska, 1997. – P. 1–4.
40. Четкин И.Р., Неуструева С.Н., Сиянова Н.С., Винтер В.Г. Влияние экстремальных факторов на накопление алкалоидов в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth // Раст. ресурсы. – 2001. – Т. 37, Вып. 2. – С. 90–96.
41. Неуструева С.Н., Сиянова Н.С., Винтер В.Г., Марданова Г.Н. Влияние света на вторичный метаболизм культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии. Материалы науч.-практ. конф. Казань, 17–18 июня 2004 г. – М.: Рус. панорама, 2004. – С. 128–133.
42. Пахомова В.М. Неспецифический адаптационный синдром и общие закономерности реактивности клеток // Цитология. – 1995. – Т. 37, Вып. 1–2. – С. 66–91.
43. Тыщенко А.А., Степаниченко Н.Н. Стабильные радикалы в природных полифенолах // Химия природных соединений. 9-й сов.-инд. симп. – Рига, 1989. – С. 68–69.
44. Запромётов М.Н. О функциональной роли фенольных соединений в растениях // Физиол. раст. – 1992. – Т. 39, Вып. 6. – С. 1197–1207.
45. Pfitzner A., Polz L., Stockigt J. Properties of vinorine synthase – the *Rauwolfia* enzyme involved in the formation of the ajmaline skeleton // Z. Naturforsch. – 1986. – Bd. 241, No 1–2. – S. 103–114.
46. Сиянова Н.С., Неуструева С.Н., Четкин И.Р., Жегалова И.В., Винтер В.Г. Стимуляция накопления аймалиновых алкалоидов в каллусе *Rauwolfia serpentina* Benth при действии различных факторов внешней среды // Новая геометрия природы. Тр. объедин. междунар. конф. 25 авг. – 3 сент. 2003 г. Т. II. Биология. Медицина. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2003. – С. 331–334.
47. Тарчевский И.А. Катаболизм и стресс у растений // 52-е Тимирязевское чтение. – М.: Наука, 1993. – 80 с.
48. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. – Казань: ФЭН, 2001. – 447 с.
49. Danilina E.E. Hormones as stress factors // Abstr. Annu. Symp. “Phys.-Chem. Basis Plant Physiol.”, Penza, Febr. 5–8 1996. – Pushchino, 1996. [Реф. в: Физиология и биохимия растений: РЖ/ВИНИТИ. – 1998. – № 3. – С. 37.]
50. Кефели В.И., Коф Э.М., Власов П.В., Кислин Е.Н. Природный ингибитор роста – абсцизовая кислота. – М.: Наука, 1989. – 184 с.
51. Николаева Л.А. Культура ткани лекарственных растений и её биотехнологическое исследование. – СПб.: Изд-во Хим.-фарм. ин-та, 1992. – 60 с.
52. Бузук Г.Б., Ловкова М.Я. Метаболизм алкалоидов: регуляция на молекулярном уровне, пространственная организация // Прикл. биохимия и микробиол. – 1995. – Т. 31, № 5. – С. 467–479.

53. Rickard B.G. Early events in geotropism of saddling shoots // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1985. – V. 36. – P. 55–75.
54. Медведев С.С., Штонда И.А. О роли ионов кальция в гравитропической реакции // *Биол. науки.* – 1989. – № 6. – С. 94–97.
55. Меркис А. Рост и развитие в зависимости от сил тяжести: опыты и проблемы // Тез. докл. 3-го съезда Всерос. о-ва физиол. раст. Санкт-Петербург, 24–29 июля 1993 г. – СПб., 1993. – С. 370.
56. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
57. Ермаков В.В. Биологическое значение селена. – М.: Наука, 1964. – 297 с.
58. Вихрева В.А. Адаптогенная роль селена в высших растениях // *Вестн. Башкирск. ун-та.* – 2001. – Вып. 2. – С. 65–66.
59. Козырева Н.С., Саменкова С.А., Блиохватов А.Ф., Иванов А.И. Влияние селена на мицелиальную культуру трутовых грибов // *Физиология растений – основа фитобиотехнологии. Тез. докл. междунар. конф. Пенза, 15–21 сент. 2003 г.* – Пенза, 2003. – С. 179–180.
60. Градова Н.Б., Сухинина Е.А., Бабусенко Е.С., Гусарова Н.А., Баум И.Ф. Рост спирулины на селеносодержащих средах // *Биотехнология.* – 2001. – № 5. – С. 40–44.
61. Пронина Н.А., Ковшова Ю.И., Попова В.В., Цоглин Л.Н. Получение биомассы *Spirulina platensis*, обогащенной микроэлементами // *Химическое и компьютерное моделирование. Бутлеровские чтения.* – 2001. – Вып. 5. – С. 51–52.
62. Severi A. Toxicity of selenium to *Lemma minor* in relation to sulfate concentration // *Physiol. Plant.* – 2001. – V. 113, No 4. – P. 523–532.
63. Seppanen M., Turakainen M., Hatikainen H. Selenium effects on oxidative stress in potato // *Plant Sci.* – 2003. – V. 165, No 2. – P. 311–319.
64. Turakainen M., Vaananen T., Anttila K., Ollilainen V., Hartikainen H., Seppanen M. Effect of selenate supplementation on glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – V. 52, No 23. – P. 7139–7143.
65. Finley J.W., Sigrid-Keck A., Robbins R.J., Hintze K.J. Selenium enrichment of broccoli: interactions between selenium and secondary plant compounds // *J. Nutr.* – 2005. – V. 135, No 5. – P. 1236–1238.
66. Комов В.П., Кириллова Н.В., Воробьева Н.А. Влияние фитогормонов на активность и молекулярную гетерогенность супероксиддисмутазы в процессе роста каллусной культуры *Rauwolfia serpentina* Benth. // *Раст. ресурсы.* – 1997. – Т. 33, Вып. 4. – С. 86–92.
67. Sairam R.K., Srivastava G.C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible genotypes in response to long term salt stress // *Plant Sci.* – 2002. – V. 162, No 6. – P. 897–904.
68. Strom A.R., Rudulier L.D., Jakowes M.W., Bunnell R.C., Valentine R.C. Osmoregulatory (Osm) genes and osmoprotective compounds // *Genet. Eng. Plants: Agr. Respect. Proc. Symp.*, 15–19 Aug., 1982. – New York; London, 1983. – P. 39–59.
69. Alvarez M.E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 44, No 3. – P. 429–442.
70. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // *Соросовский образов. журн.* – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
71. Minorsky P.V. Selenium in Plants // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133, No 9. – P. 14–15.
72. Hatfield D. Selenocysteinyl-RNAs recognize UGA in *Beta vulgaris*, a higher plant, and in *Gliocladium virens* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1992. – V. 184. – P. 254–259.

73. *Hartikainen H., Xue T.L., Piironen V.* Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass // *Plant Soil.* – 2000. – V. 225, No 1–2. – P. 193–200.
74. *Жильцова Т.С., Шагова М.В., Градова Н.Б., Голубкина Н.А.* Исследование резистентности дрожжей рода *Candida* к соединениям селена // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 567–570.
75. *Жильцова Т.С., Белов А.П., Градова Н.Б.* Накопление и распределение селена в клетках, обогащенных селеном дрожжей рода *Candida* // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1998. – Т. 34, № 2. – С. 186–188.
76. *Lauchli A.* Selenium in Plants: Uptake, Functions, And Environmental toxicity // *Bot. Acta.* – 1993. – V. 106. – P. 455–468.
77. *Нейсон А.* Роль ванадия и молибдена в обмене веществ у растений и животных // *Микроэлементы: сб. ст.* – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – С. 350–385.
78. *Smith J.I., Smart N.J., Misawa M., Kurz W.G.W., Tallevi S.G., DiCosmo F.* Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadil sulfate // *Plant Cell Repts.* – 1987. – V. 6, No 2. – P. 142–145.
79. *Tallevi S.G., DiCosmo F.* Stimulation of indole alkaloid content in vanadium-treated *Catharanthus* suspension cultures // *Plant med.* – 1988. – V. 54, No 2. – P. 149–152.
80. *Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Бузук Л.Н.* Роль элементов и физиологически активных соединений в регуляции образования и накопления индольных алкалоидов *Catharanthus roseus* L. // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 340–346.
81. *Арнон Д.И.* Роль микроэлементов в питании растений, в частности в фотосинтезе и усвоении азота // *Микроэлементы: сб. ст.* – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – С. 9–49.
82. *Zabotina O.A., Lozovaya V.V., Malychov R.I.* Bioactive pectin oligosaccharides from pea stem cell walls // *Abstr. VI Cell Wall Meet., Nijmegen.* – Nijmegen, 1992. – P. 226.
83. *Неуструева С.Н., Аськеева Л.Б., Жегалова И.В., Сиянова Н.С., Куприянов-Ашин Э.Г.* Оптимизация условий выращивания культуры ткани раувольфии змеиной. – Казань, 1992. – 13 с. – Деп. в ВИНТИ 30.12.92, № 3717-В-92.

Поступила в редакцию
05.02.08

Сиянова Нина Сергеевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Неуструева Светлана Николаевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии Казанского государственного университета.