

Е.В. СПИРИДОНОВА, Д.М. АДНОФ,
И.О. АНДРЕЕВ, В.А. КУНАХ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
03143 Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОМА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ ПРИ ПЕРЕВОДЕ В УСЛОВИЯ ГЛУБИННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ



Установлено, что геном каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе с поверхностного на глубинное выращивание в жидкой среде специального состава не претерпевает заметных изменений на протяжении нескольких первых пассажей. После 4–6 пассажей роста тканей в глубинной культуре обнаружен полиморфизм RAPD-спектров, который может отражать как изменения последовательности ДНК, так и генетической структуры клеточной популяции, формирующей штамм. Введение промежуточного пассажа на твердой среде более простого состава перед переводом в жидкую среду не оказывает существенного влияния на уровень и характер изменений генома.

© Е.В. СПИРИДОНОВА, Д.М. АДНОФ, И.О. АНДРЕЕВ,
В.А. КУНАХ, 2008

Введение. Раувольфия змеиная *Rauwolfia serpentina* Benth. представляет собой источник индольных алкалоидов, которые широко используются для изготовления лекарственных препаратов, имеющих гипотензивное, противоаритмическое и психотропное действие. Дефицит природного сырья обуславливает стойкий интерес к культурам тканей *in vitro* этого растения как альтернативному источнику биомассы для получения ценных метаболитов. В результате длительных разработок, проводившихся в Ленинградском химико-фармацевтическом институте (в настоящее время Химико-фармацевтическая академия, г. Санкт-Петербург, Россия) и в нашей лаборатории, на основании культуры тканей *R. serpentina*, полученной Р.Г. Бутенко в 1962 г., было создано несколько клеточных штаммов и линий, наибольшей продуктивностью из которых обладает каллусный штамм К-27 [1–4].

Штамм К-27 характеризуется повышенной продуктивностью индольных алкалоидов, в частности противоаритмического алкалоида аймалина, и более 25 лет выращивается в стандартизованных условиях, обеспечивающих при поддерживающем отборе накопление 0,9–1,2 % аймалина в сухой биомассе [3, 4].

Однако при выращивании каллусных тканей в условиях поверхностного роста на агаризованной питательной среде в промышленных масштабах, проводившемся в 90-х годах прошлого столетия на Харьковском химфармобъединении «Здоровье», был выявлен ряд недостатков упомянутой технологии. Для промышленного производства биомассы более эффективными являются способы суспензионной или глубинной культур, предполагающие выращивание клеточных агрегатов или тканей в жидких питательных средах в ферментерах значительно объема.

Ранее в нашем отделе был проведен комплексный эксперимент, направленный на адаптацию штамма К-27 к условиям промышленного производства, в частности на оптимизацию условий выращивания в жидкой питательной среде. Было показано, что в специально подобранных условиях глубинной культуры происходит ускорение накопления алкалоидов, что позволяет сократить время культивирования тканей до сбора урожая. Результаты изучения накопления индолиновых алкалоидов и общей продуктивности штамма К-27 при выра-

щивании его в различных условиях (поверхностном и глубинном) на разных типах питательных сред были опубликованы ранее [5, 6]. Вместе с тем, учитывая обширные литературные данные, демонстрирующие на цитологическом уровне значительную изменчивость генома клеток растений в культуре *in vitro*, остался открытым вопрос о стабильности генома культивируемых тканей при значительном изменении условий выращивания, а именно в случае перехода от поверхностной культуры к глубинной в жидкой среде, отличающейся по составу от стандартной для штамма К-27. Для решения этого вопроса методом RAPD-ПЦР

Таблица 1
Перечень использованных праймеров и характеристика продуктов, полученных при ПЦР с ДНК исследованных вариантов штамма К-27 *R. serpentina*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Количество	
		ампликонов	мажорных ампликонов
A01 *	CAGGCCCTTC	15	8
A02	TGCCGAGCTG	5	5
A03 *	AGTCAGCCAC	10	6
A04	AATCGGGCTG	7	4
A05	AGGGGTCTTG	14	6
A07	GAAACGGGTG	11	3
A08	GTGACGTAGG	8	5
A09	GGGTAACGCC	8	4
A11	CAATCGCCGT	3	3
A12 *	TCGGCGATAG	12	3
A13 *	CAGCACCCAC	16	6
A14	TCTGTGCTGG	7	1
A16 *	AGCCAGCGAA	12	1
A17	GACCGCTTGT	8	4
A18	AGGTGACCGT	11	3
A19 *	CAAACGTCGG	9	3
A20	GTTGCGATCC	9	2
B01 *	GTTTCGCTCC	10	5
B02	TGATCCCTGG	5	2
B04 *	GGA CTGGAGT	11	4
B05	TGCGCCCTTC	14	4
B06	TGCTCTGCCC	11	4
B07	GGTGACGCAG	10	6
B08	GTCCACACGG	7	3
B10	CTGCTGGGAC	9	7
Всего		242	103

*Праймеры, продукты амплификации с которыми обнаруживали вариабельность между исследуемыми объектами.

было проведено исследование генетического материала каллусной ткани штамма К-27, выращивавшейся в жидкой среде РЖ в течение различного срока.

Материалы и методы. В работе использовали гормонезависимый каллусный штамм К-27 *R. serpentina*, продуктивность, генетические и биохимические особенности которого описаны в работах [4, 7]. Штамм был получен путем обработки тканей клеточной линии А [2] мутагеном этиленимином и дальнейшей селекции по признаку «содержание алкалоидов» на специально разработанной питательной среде, обеспечивающей высокий уровень накопления индолиновых алкалоидов [3]. С 1982 г. штамм К-27 выращивается на агаризованной среде 10С по [8] (клеточная линия К-27(10С)). Кроме того, в экспериментах использовали агаризованную среду 5С по [9], а также питательную среду РЖ по [10], специально разработанную для глубинного выращивания культуры тканей *R. serpentina*. Каллусные культуры выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл агаризованной среды, в темноте при 24–26 °С. Жидкие культуры выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды, на продольном шейкере при покачивании с частотой 60–70 колебаний в 1 мин, в темноте при температуре 24–26 °С. Размер экспланта при пересадках составлял 4–5 г живой ткани на колбу. При проведении эксперимента (рис. 1) ткань переносили в другую среду и культивировали на протяжении шести пассажей. Ткань для анализа ДНК отбирали в конце каждого пассажа (на 30-е сутки роста).

ДНК из культивируемых тканей выделяли с использованием цетавлона по методике [11]. Концентрацию и качество препаратов ДНК определяли визуальнo по интенсивности флюоресценции комплексов ДНК – бромистый этидий в УФ-свете после фракционирования в 1%-ном агарозном геле.

Анализ генома проводили методом RAPD-ПЦР. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» («ДНК-технологии», Россия). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 × ПЦР-буфер с 2 мМ MgCl₂ («Медбиосервис», Киев), 0,2 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы («Амплисенс», Москва), 0,25

мкМ праймера («Литех», Москва), 20 нг анализируемой ДНК. На нее наслаивали 20 мкл минерального масла. Для ПЦР использовали программу: денатурация 94 °С/2 мин; 5 циклов: денатурация 94 °С/30 с, отжиг 36 °С/30 с, элонгация 72 °С/1 мин; 35 циклов: денатурация 94 °С/20 с, отжиг 36 °С/20 с, элонгация 72 °С/40 с; элонгация 72 °С/2,5 мин. В работе было использовано 25 десятинуклеотидных праймеров (табл. 1). ПЦР с каждым праймером проводили в двух повторностях. Продукты амплификации разделяли в 1,7%-ном агарозном геле с бромистым этидием в 1 × ТВЕ-буфере при напряженности электрического поля 2 В/см. Гели фотографировали в проходящем ультрафиолете с использованием светофильтра «О × 2». При анализе электрофореграмм учитывали только четко различимые и воспроизводимые в повторных реакциях фрагменты. Для каждого из объектов рассчитывали долю полиморфных локусов по сравнению с исходным штаммом К-27, который выращивали в стандартных условиях на среде 10С.

Результаты исследований и их обсуждение.

Изучали реакцию генома клеточной линии К-27(10С) *R. serpentina* при изменении состава питательной среды и условий выращивания, в частности, при переходе от поверхностного выращивания каллусной ткани к глубинному, а также динамику изменений генома при дальнейшем выращивании в глубинной культуре. При проведении эксперимента в одном варианте ткань с агаризованной среды 10С перенесли в жидкую среду РЖ – полученный вариант культивируемых тканей был обозначен как РЖ (10С). В другом случае перед переносом ткани линии К-27(10С) в жидкую среду вводили промежуточный пассаж (30 сут) на агаризованной среде более простого состава 5С. Ткань выращивали в условиях глубинной культуры на протяжении шести пассажей и в конце каждого пассажа отбирали пробы для проведения анализа генома методом RAPD-ПЦР. В качестве контроля для сравнения использовали ткань штамма К-27, постоянно растущую на безгормональной твердой среде 10С. Обобщенная схема эксперимента представлена на рис. 1.

Среды 5С и РЖ отличались от стандартной для штамма К-27 среды 10С по содержанию микро- и макросолей, сахара и витамина В₁.



Рис. 1. Схема эксперимента по изучению влияния выращивания в глубинной культуре на геном гормонезависимой клеточной линии К-27(10С) *R. serpentina* с обозначениями проанализированных вариантов культивируемых тканей

Основные отличия в составе использованных сред представлены в табл. 2. Так, в средах 5С и РЖ содержание сахара было снижено в 2 и 4 раза соответственно. Кроме того, в средах 5С и РЖ почти в 2 раза уменьшено содержание азота, а в 5С соотношение количества азота в составе аминокрупп и нитратных групп изменено в сторону увеличения последних.

Для исследования был применен метод RAPD-ПЦР, к достоинствам которого можно отнести то, что он не требует знания последовательностей ДНК анализируемого генома и позволяет провести оценку большого количества участков, случайным образом распределенных по всему геному. В ходе предварительных иссле-

Таблица 2
Основные отличия в составе питательных сред, использованных для выращивания культуры тканей *R. serpentina*

Компоненты среды	10С по [8]	5С по [9]	РЖ по [10]
Витамин В ₁ , мг/л	5	1	1
NH ₂ NO ₃ , mM	31	6	3,7
KNO ₃ , mM	3,3	12	12
MgSO ₄ , mM	5,3	2	2
NH ₄ H ₂ PO ₄ , mM	1,7	5,2	2,4
(NH ₄) ₂ HPO ₄ , mM	2,27	2,27	1,5
CoCl ₂ , мкМ	0,42	0,1	0,1
H ₃ BO ₃ , mM	0,185	0,1	0,1
FeSO ₄ , mM	0,363	0,107	0,107
Na ₂ ЭДТА, мг/л	49	37,5	37,5
Сахароза, г/л	100	50	25

Примечание. Твердые среды 10С и 5С для поверхностного выращивания содержали также 8–9 г/л агара.

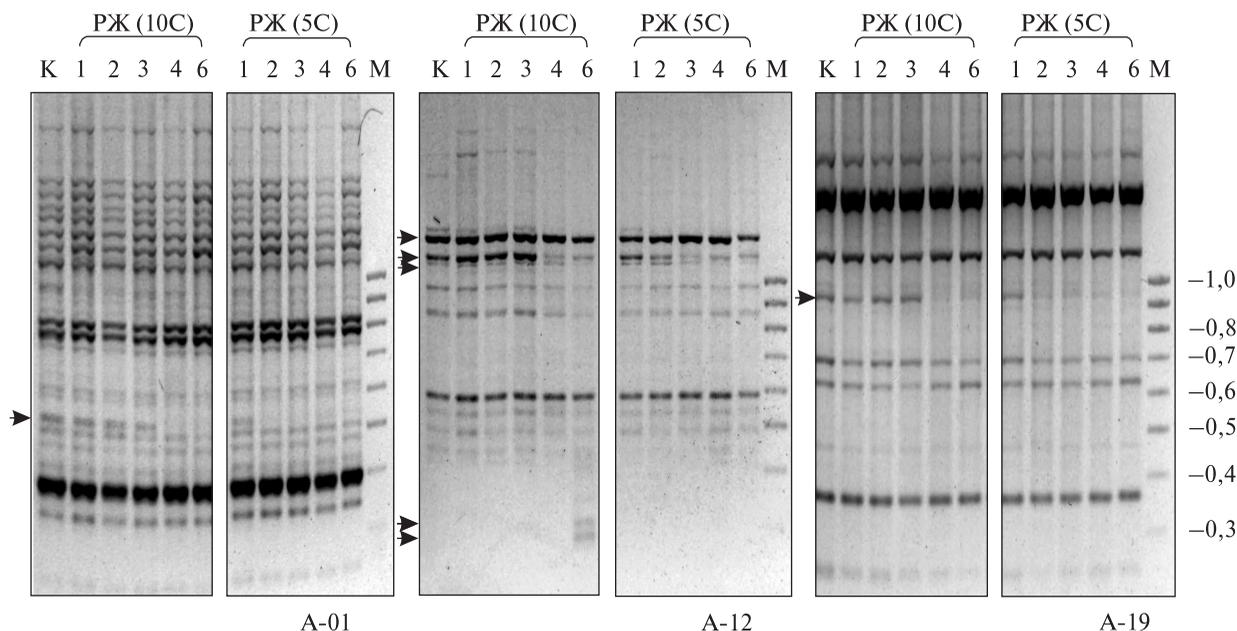


Рис. 2. Вариабельность RAPD-спектров вариантов культивируемых тканей *R. serpentina* штамма К-27, полученных в результате выращивания в глубинной культуре: К – контроль, клеточная линия К-27(10С); РЖ (10С) и РЖ (5С) – обозначения проанализированных вариантов ткани; 1, 2, 3, 4, 6 – количество пассажей в жидкой среде РЖ; М – маркер длин фрагментов ДНК «100 бр». Стрелками указаны полиморфные ампликоны, названия использованных праймеров приведены под каждой электрофореграммой справа, тыс. п.н.

дований были отобраны десятинуклеотидные праймеры с произвольной последовательностью, которые обеспечивали образование четких воспроизводимых спектров амплификации, выявлявших межвидовой полиморфизм у представителей рода *Rauwolfia* (И.О. Андреев, Е.В. Спиридонова, неопубликованные данные). В настоящей работе использовали 25 праймеров, спектр продуктов которых для ДНК клеточной линии К-27 содержал от 3 до 16 фрагментов, в среднем 9,9 ампликона на праймер (табл. 1). При анализе полученных электрофореграмм учтено 242 четко выраженных воспроизводимых ампликона. Продукты амплификации имели размер 200–2000 п.н. и были представлены в спектрах мажорными и минорными фрагментами. Сумма мажорных фрагментов составила 103, что соответствует 42,6 % общего количества ампликонов (табл. 1).

Полиморфизм между исследованными вариантами культивируемых тканей был обнаружен в спектрах ПЦР-продуктов семи праймеров (табл. 3). При анализе электрофореграмм было выявлено 11 полиморфных ампликонов (4,5 %). Большинство отличий заключалось в

изменении яркости отдельных фрагментов, и лишь на поздних этапах культивирования в глубинной культуре (4-й и 6-й пассажи) обнаруживали появление продуктов, отсутствовавших в спектрах исходной клеточной линии К-27 (10С). Следует отметить, что полиморфизм был обусловлен преимущественно вариабельностью минорных фрагментов. Выявлен всего один мажорный фрагмент (полученный с праймером А-12), количество которого изменялось в спектрах тканей обоих вариантов в третьем-шестом пассажах глубинного культивирования. Некоторые из RAPD-спектров, обнаруживающие генетический полиморфизм проанализированных тканей, представлены на рис. 2.

При анализе полученных данных не было обнаружено изменений генома в ткани клеточной линии К-27(10С) в течение первых трех пассажей в условиях глубинной культуры в случае прямого переноса тканей с агаризованной среды 10С в жидкую среду РЖ (вариант РЖ (10С)). При введении промежуточного пассажа на агаризованной питательной среде более простого состава 5С (вариант РЖ (5С)) изменения наблюдались уже после второго пасса-

жа в условиях глубинной культуры (табл. 3). Несмотря на общую тенденцию возрастания уровня изменчивости с увеличением длительности пребывания ткани в условиях глубинной культуры, в динамике появления полиморфных фрагментов у разных вариантов наблюдали отличия. У варианта РЖ (10С) изменения появлялись лишь в четвертом пассаже, при этом количество полиморфных фрагментов возрастало скачкообразно от 0 % в третьем до 3,3 % в четвертом пассаже и увеличивалось до 4,5 % в шестом пассаже. У варианта РЖ (5С) накопление изменений происходило медленнее: полиморфные фрагменты в небольшом количестве (1,2 %) появлялись уже после второго пассажа, затем их численность возрастала до 1,7 % в третьем и 3,3 % в четвертом пассажах. Различий по уровню изменений между тканями варианта РЖ (5С), пребывавшими в глубинной культуре четвертого и шестого пассажей, обнаружено не было.

Несмотря на различия во времени появления, изменения RAPD-спектров у обоих вариантов в большинстве своем носили однотипный характер: изменения затрагивали одни и те же ампликоны и имели одинаковую направленность. Исключение составляли лишь минорные фрагменты – продукты праймеров А-

12 и В-04, обнаруженные в спектрах варианта РЖК (10С) после 4–6 пассажей выращивания в глубинной культуре.

В результате проведенных исследований установлено, что при переходе к выращиванию в глубинной культуре геном клеточной линии К-27(10С) остается относительно стабильным по крайней мере в течение одного-двух пассажей. В частности, использованные RAPD-маркеры не обнаружили отличий от исходной линии в тканях, которые со среды 10С переносили в жидкую питательную среду РЖ (вариант РЖ (10С)) и выращивали в глубинной культуре на протяжении трех пассажей. Однако уже после четвертого пассажа отмечалось возникновение изменений, проявлявшихся в виде ряда полиморфных RAPD-фрагментов, количество которых возрастало при дальнейшем культивировании. В случае введения промежуточного пассажа на агаризованной среде более простого состава 5С (вариант РЖ (5С)) изменения генома клеточной линии К-27 (10С) на среде РЖ обнаруживались значительно раньше, т.е. уже после двух пассажей в глубинной культуре. Вместе с тем в упомянутом варианте скорость накопления изменений была ниже, чем в случае прямого перевода на среду РЖ. После четырех пассажей варианты

Таблица 3

Динамика изменений спектров RAPD-ампликонов тканей штамма К-27 раувольфии змеиной при выращивании в условиях глубинной культуры на среде РЖ

Вариант и номер пассажа	Праймер							Количество полиморфных ампликонов	
	А-01	А-03	А-12	А-13	А-19	В-01	В-04	абс.	отн., %
РЖ(10С)									
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	1↓	1↓	*1↓, 1↓	1↑	1↓	1↑	1+	8	3,3
6	1↓	1↓	*1↓, 2↓, 2+	1↑	1↓	1↑	1+	11	4,5
РЖ(5С)									
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	1↓	–	1↓	–	1↓	–	–	3	1,2
3	1↓	–	*1↓, 1↓	–	1↓	–	–	4	1,7
4	1↓	1↓	*1↓, 2↓	1↑	1↓	1↑	–	8	3,3

Примечание. «+» – появление фрагмента; ↓ – снижение количества фрагмента; ↑ – увеличение количества фрагмента; * – изменения мажорных фрагментов.

РЖ (10С) и РЖ (5С) не отличались по количеству полиморфных фрагментов, а в шестом пассаже количество полиморфных фрагментов было больше у варианта РЖ (10С).

Чем же объяснить происходящие в течение столь короткого времени (1–3 пассажа, или 30–90 сут) изменения генома клеточной линии К-27(10С)? Ранее были получены данные, которые показывают, что переход от поверхностного выращивания к глубинному оказывает значительное стрессовое воздействие на геном культивируемых тканей. Показано, что уровень хромосомных aberrаций в культуре тканей клеточной линии *A. R. serpentina*, которая является предшественником линии К-27, при переводе в глубинную культуру в среде РЖ возрастает до 10 %, что в 6–7 раз выше аналогичного показателя при поверхностном выращивании на агаризованной среде [12, 13]. При проведении молекулярно-генетического анализа было установлено, что уровень полиморфизма RAPD-ампликонов в случае перевода каллусной культуры с агаризованной среды в жидкую без изменения ее состава значительно выше, чем при переводе на твердую среду со сниженным содержанием сахарозы и измененным составом минеральной основы (Спиридонова и др., в печати). Значительный стресс может быть обусловлен, в первую очередь, прямым контактом клеток с компонентами питательной среды в условиях глубинной культуры, тогда как при выращивании на твердой среде с ней соприкасаются лишь часть клеток. Определенный вклад в стрессовое воздействие могут вносить также постоянное перемешивание и степень аэрации жидкой среды.

Наряду с этим выращивание каллусной ткани линии А в глубинной культуре в среде РЖ не приводило к заметным изменениям генетической структуры на цитологическом уровне, а лишь влияло на динамику роста в течение пассажа [12, 13]. Кроме того, характер наблюдаемых изменений, а именно то, что полиморфизм обнаруживают преимущественно минорные фрагменты и выражается он главным образом в вариации количественной представленности ампликонов в спектре, наводит на мысль о возможности другого объяснения обнаруженных генетических отличий.

Как было показано ранее, штамм К-27 ха-

рактеризуется значительным полиморфизмом клеток и ядер. Размах изменчивости по числу хромосом находится в границах 14–200 при $2n = 22$ с модальным классом клеток, содержащих 28–38 хромосом, т.е. околотриплоидными клетками [7]. Вполне вероятно, что гетерогенность по ряду цитологических показателей клеточной популяции, представляющей собой штамм К-27, проявляется и на молекулярном уровне. Изменение условий выращивания при переходе к условиям глубинной культуры может приводить к изменению генетической структуры клеточной популяции (см. например [4, с. 325–341]). В таком случае количественные вариации минорных ампликонов можно интерпретировать как следствие изменения соотношения клеток, принадлежащих к различным генетическим классам. В пользу такой интерпретации свидетельствует и сходный характер изменений RAPD-спектров в исследованных вариантах глубинной культуры, что было бы маловероятно в результате случайных изменений генетического материала, но легко объяснимо, если предположить, что культивирование в одинаковых условиях приводит к однотипным изменениям генетической структуры клеточной популяции.

Таким образом, выращивание каллусной ткани клеточной линии К-27(10С) в условиях глубинной культуры в жидкой среде РЖ, отличающейся по составу от стандартной для штамма агаризованной среды 10С, не сопровождается заметными изменениями генома на протяжении нескольких первых пассажей. После 4–6 пассажей роста в глубинной культуре наблюдается полиморфизм RAPD-спектров, который может отражать как изменения последовательности ДНК, так и генетической структуры клеточной популяции, формирующей штамм. Введение промежуточного пассажа на твердой среде 5С более простого состава перед переводом в жидкую среду РЖ не оказывает существенного влияния на уровень и характер изменений генома после 4–6 пассажей пребывания тканей в глубинной культуре. Поскольку полученные нами результаты демонстрируют невысокий уровень изменчивости генома каллусных тканей штамма К-27 при выращивании в жидкой питательной среде, предложенный подход выращивания каллус-

ных тканей штамма К-27 в глубинной культуре в течение нескольких пассажей может быть использован с целью промышленной обработки биомассы.

SUMMARY. Genome of *Rauwolfia serpentina* callus cells was found to fail undergo the noticeable changes for several early passages upon the switch from surface to submerged cultivation in the liquid medium of special composition. After subsequent 4–6 passages in submerged culture RAPD spectra polymorphism was revealed which may reflect the changes in DNA sequence as well as in the structure of cell population that forms the strain. Introduction of the intermediary passage on the agar-solidified medium of more simple composition prior to transfer into liquid medium appeared not to affect essentially the level and the pattern of genome changes.

РЕЗЮМЕ. Встановлено, що геном калусних тканин раувольфії зміної при переведенні з поверхневого на глибинне вирощування в рідкому середовищі спеціального складу не зазнає помітних змін протягом кількох перших пасажів. Після 4–6 пасажів росту тканин у глибинній культурі виявлено поліморфізм RAPD-спектрів, що може відображати зміни як послідовності ДНК, так і генетичної структури клітинної популяції, що формує штам. Введення проміжного пасажу на твердому середовищі спрощеного складу перед переведенням у рідке середовище істотно не впливає на рівень і характер змін геному.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалева Т.А., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Цитологическое изучение культуры ткани раувольфии (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Генетика. – 1968. – 4, № 15. – С. 5–13.
2. Воллосович Н.Е., Воллосович А.Г., Ковалева Т.А. и др. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность // Растит. ресурсы. – 1976. – 12, № 4. – С. 578–583.
3. Kunakh V.A., Alkhimova E.V. *Rauwolfia serpentina*: In vitro culture and the production of ajmaline // Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 7. Medicinal and Aromatic Plants / Ed. Y.P.S. Bajaj. – Berlin : Springer-Verlag, 1989. – P. 398–416.
4. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 724 с.
5. Кунах В.А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н.Ю., Можилевская Л.П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка. – 2006. – 22, № 2. – С. 149–156.
6. Мирюта Н.Ю., Аль-Аммури Ю., Ревякина О.Ю. и др. Изменчивость параметров продуктивности при поверхностном и глубинном выращивании каллусных тканей раувольфии змеиной – продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С. 64–73.
7. Kunakh V.A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 36. Somaclonal Variation in Crop Improvement / Ed. Y.P.S. Bajaj. – Berlin : Springer, 1996. – P. 315–332.
8. А.с. СССР № 1167895. Воллосович А.Г., Мартынова Т.Ю., Полищук С.Я. Питательная среда для выращивания культуры ткани раувольфии змеиной продуцента алкалоидов // Заявл. 08. 03. 1985. (Не опубл.)
9. Воллосович А.Г., Пучинина Т.Н., Николаева Л.А. Оптимизация состава макроселей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растит. ресурсы. – 1979. – 15, № 4. – С. 516–528.
10. Каухова И.Е., Воллосович А.Г., Цыганков В.А. Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Растит. ресурсы. – 1981. – 17, № 2. – С. 217–224.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство : Пер с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
12. Каухова И.Е., Кунах В.А., Легейда В.С., Воллосович А.Г. Цитологическое изучение высокопродуктивной клеточной линии *Rauwolfia serpentina* Benth. при глубинном выращивании // Цитология и генетика. – 1981. – 15, № 3. – С. 33–37.
13. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Губарь С.И. Особенности получения и продуктивность суспензионных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. in vitro // Биотехнология. – 2001. – № 4. – С. 9–21.

Поступила 20.02.07