

На правах рукописи

Для служебного пользования

УДК 578.085.23 : 581.1

Экз. № 000085 \*

ШЕПЕЛЕВ  
Виктор Николаевич

**ВЛИЯНИЕ ОТБОРА И ИЗМЕНЕНИЯ УСЛОВИЙ  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКА  
«СОДЕРЖАНИЕ ИНДОЛИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ»  
В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ**

Специальность 03.00.25. — Клеточная биология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории генетики клеточных популяций Института цитологии АН СССР.

Научный руководитель — доктор биологических наук, профессор Ю. Б. Вахтин.

Официальные оппоненты — доктор биологических наук, проф. Л. З. Кайданов; доктор биологических наук Л. И. Орел.

**Ведущее учреждение — Институт физиологии растений и генетики АН УССР**

---

Защита состоится «19» октября 1990 г. в 10 часов на заседании Специализированного совета Д 002.73.01 при Институте цитологии АН СССР по адресу: 194064, Ленинград, Тихорецкий пр., 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР.

Автореферат разослан «18» сентября 1990 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета,  
кандидат биологических наук

Л. Н. Писарева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** За последние годы достигнут большой прогресс в культивировании растительных клеток и тканей. Культуры клеток растений широко используются для выяснения различных аспектов клеточной биологии, в том числе проблем цитодифференцировки и клеточной пролиферации (Gray, 1988), находят широкое применение как исходный материал для получения новых растений (Roche, 1987). Наряду с этими исследованиями развернулось интенсивное изучение возможности использования растительных культур в качестве продуцентов биологически активных соединений (Bajaj, 1989). При всей перспективности подобного рода исследований случаи получения пригодных для промышленного применения штаммов все еще немногочисленны: налажено производство шиконина на основе культуры клеток *Lithospermum erythrorhizon* в Японии (Tanaka, 1987), начато промышленное освоение способа получения аймалина из культуры ткани раувольфии змеиной в СССР. Культура ткани раувольфии змеиной является продуцентом широкого спектра индольных алкалоидов, среди которых особое значение имеет высокоэффективное антиаритмическое средство - аймалин. Следует отметить, что используемые в настоящее время штаммы культуры раувольфии обладают относительно низкой продуктивностью, что приводит к большой стоимости конечного продукта. Это относится и к используемому штамму-продуценту К-20, созданному на основе культуры раувольфии, полученной в лаборатории Р.Г.Бутенко, который был усовершенствован в результате многолетней работы (Николаева и др., 1985).

Накопленный к настоящему времени опыт свидетельствует, что в большинстве случаев первичные культуры растительных клеток не пригодны для промышленного получения биопрепаратов даже в случае тех или иных модификаций питательной среды. Становится также ясно, что существенным препятствием для получения продуктивных штаммов растительных клеток является недостаточное знание закономерностей процессов наследственной изменчивости в популяциях растительных клеток при их продолжительном культивировании. До настоящего времени не разработаны эффективные методы искусственного отбора в популяциях культивируемых растительных клеток, (Widholm, 1988), остаются неясными возможности определения

наследуемости селективируемых признаков (Вахтин, 1984).

В этой связи исследование влияния искусственного отбора и изменений условий культивирования на изменчивость содержания индолиновых алкалоидов в популяции клеток раувольфии змеиной представляет интерес не только для изучения генетических процессов в клеточных популяциях, но и для разработки методов эффективной селекции растительных штаммов-продуцентов, пригодных для промышленного использования.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилось изучение соматоклональной изменчивости по признаку "содержание индолиновых алкалоидов" в популяции клеток раувольфии змеиной при различных условиях культивирования. При этом культивирование проводилось на фоне постоянно действующего искусственного отбора вариантов, обладающих максимальным содержанием индолиновых алкалоидов.

Были поставлены следующие основные задачи данного исследования:

1. Изучить влияние условий, модифицирующих процессы пролиферации и дифференцировки клеток, на фенотипическую гетерогенность популяции клеток раувольфии змеиной по признаку "содержание индолиновых алкалоидов".

2. Определить коэффициент наследуемости признака "содержание индолиновых алкалоидов" при использованных условиях культивирования и исследовать изменение коэффициентов наследуемости этого признака в ходе длительной селекции.

3. Разработать на основе литературных данных и экспериментально апробировать новую схему селекции клеточной популяции раувольфии змеиной на повышение содержания индолиновых алкалоидов, включающую отбор клонов с максимальной продуктивностью в каждом поколении и выращивании отобранных вариантов при измененных условиях культивирования.

**Научная новизна.** Впервые предложен и апробирован метод "циклической селекции" для получения нового штамма-продуцента культуры клеток растений. Полученный в результате селекции новый субштамм раувольфии змеиной отличается от исходного штамма К-20 повышенным темпом роста и увеличенной в 2 раза продуктивностью по индолиновым алкалоидам. Впервые охарактеризована фенотипическая гетерогенность популяции клеток раувольфии

змеиной по признаку "содержание индолиновых алкалоидов" при различных условиях культивирования (при разных концентрациях сахарозы в питательной среде и температурах культивирования, при воздействии на культуру различных доз гамма-облучения, при добавлении в питательную среду фитогормонов и аналога триптофана). Впервые определены коэффициенты наследуемости признака "содержание индолиновых алкалоидов" в популяции клеток раувольфии змеиной при действии искусственного отбора на фоне условий культивирования, различно влияющих на пролиферацию и дифференцировку клеток в культуре. Показано, что длительная (25 повторностей отбора) селекция на повышение содержания индолиновых алкалоидов на фоне меняющихся в каждом пассаже условий культивирования не приводит к наследственной однородности популяции по селективируемому признаку.

**Практическая ценность.** Полученный в результате селекции субштам культуры раувольфии змеиной, превосходящий исходный штамм К-20 по продуктивности в 2 раза, может представлять интерес для промышленного получения аймалина, поскольку способен обеспечить существенное снижение себестоимости продукта. Разработанные в ходе работы новые методы выделения аймалина и модификации условий культивирования, стимулирующие продуктивность культуры, представляют интерес как для дальнейшего исследования популяций клеток раувольфии, так и для интенсификации промышленного производства аймалина из культуры ткани раувольфии змеиной.

**Публикации и апробация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 5 работ, получено 2 авторских свидетельства на изобретение. Результаты исследования докладывались на лабораторных семинарах Института цитологии АН СССР (1984-1989 гг.), на III Всесоюзном совещании по генетике соматических клеток в культуре (Звенигород, 1986), Научной конференции молодых ученых Института цитологии АН СССР (Ленинград, 1987), на V съезде ВОГИС им.Н.И.Вавилова (Москва, 1987), на III Всесоюзной конференции молодых ученых по физиологии растительной клетки (Петрозаводск, 1988), на I Всесоюзном радиобиологическом съезде (Москва, 1989).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 132 страницах, включая 8 таблиц, 17 рисунков и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы

исследования; результаты, обсуждение, выводы и список литературы из 112 публикаций.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использован штамм К-20 культуры ткани раувольфии змеиной (Николаева и др., 1985), полученный из Ленинградского химико-фармацевтического института. Культура выращивалась на стандартной питательной среде без фитогормонов с 6% сахарозы (Воллосович, Пучинина, 1984) при 27° С (стандартные условия). Для модификации условий культивирования применяли добавление в питательную среду фитогормонов - 30 мг/л индолилуксусной кислоты и 1 мг/л кинетина (Купахн, Алхимова, 1989), 5-метилтриптофана (45 мг/л), изменение концентрации сахарозы в питательной среде до 4% и 10% (Воллосович и др., 1985); выращивание при 23° С и 34° С, гамма-облучение в различные фазы роста. Облучение проводили на установке ЛЕМ-У-1 (60Co), мощность дозы 31 Гр/мин. Для изучения влияния гамма-облучения на рост субкультур и содержание в них индолиновых алкалоидов и для построения математических моделей этого влияния использовали метод многофакторного планирования на трех уровнях (Маркова, Лисенков, 1979). При культивировании в различных условиях определяли сухую массу субкультур и содержание в них индолиновых алкалоидов по методу Воллосович и др., 1977; Пучинина, 1984.

Для осуществления селекции 150 субкультур штамма К-20 выращивали при стандартных условиях и тестировали на содержание индолиновых алкалоидов. Отобрали 20 субкультур с наибольшим содержанием алкалоидов и каждую из них рассеяли в 7-8 флаконов. Субкультуры, полученные от одной "родительской" субкультуры, рассматривали как соматоклон, а их изменчивость как внутриклональную изменчивость. Полученные субкультуры выращивали при измененных условиях. Через 24-63 сут проводили тестирование на содержание алкалоидов и вновь производили отбор самых продуктивных субкультур, которые рассеивали по флаконам и затем выращивали при измененных условиях. В ходе селекции выращивание периодически проводили при стандартных условиях, что позволяло контролировать эффективность проводимого отбора. Период отбора между выращиваниями в стандартных условиях составлял 1 цикл селекции. Всего проведено 25 поколений отбора (6 циклов). В

каждом поколении определяли характер распределения субкультур по содержанию индолиновых алкалоидов, а так же среднее значение и характеристики изменчивости этого показателя - дисперсию и коэффициент вариации. Коэффициент наследуемости ( $h^2$ ) признака "содержание индолиновых алкалоидов" определяли методом однофакторного дисперсионного анализа, а для оценки его статистической значимости использовали непараметрический метод Крускала-Воллиса (Глотов и др., 1982). Подробное изучение динамики роста и накопления алкалоидов осуществляли в начале и конце селекции.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по динамике роста штамма К-20 и накоплению в нем индолиновых алкалоидов в стандартных условиях культивирования приведены на рис.1.

Из представленных данных следует, что лаг-фаза роста продолжается до 15 сут, экспоненциальная фаза - с 15 по 55 сут,

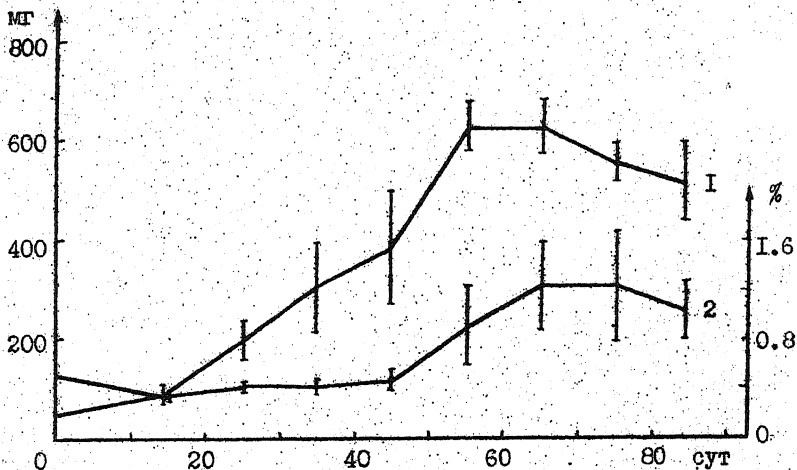


Рис.1. Динамика роста штамма К-20 /1/ и накопление в нем индолиновых алкалоидов /2/ при стандартных условиях культивирования. По оси абсцисс - возраст культуры, сут; по оси ординат: слева - сухая масса культуры, мг; справа - содержание индолиновых алкалоидов, %.

а с 55 сут. начинается стационарная фаза с последующей частичной деградацией культуры. Интенсивный процесс накопления алкалоидов происходит с 45 по 65 сут., при этом среднее содержание индолиновых алкалоидов достигает 1,2%. Полученные данные по динамике роста и накопления алкалоидов совпадают с литературными данными (Николаева и др., 1985; Кунак, 1989). Таким образом, через 55-65 сут. роста продуктивность культуры достигает максимума. В этот же период различия вариантов по содержанию алкалоидов наиболее легко обнаруживаются. Поэтому тестирование субкультур при селекции было решено проводить именно в эти сроки, которые соответствуют концу экспоненциальной и началу стационарной фазы роста.

Анализ литературных данных показывает, что прямой отбор на повышение содержания вторичных метаболитов в культурах растительных клеток часто является эффективным лишь на первых этапах селекции (Deus-Neumann, Zenk, 1984; Вахтин и др., 1985). В результате нескольких повторностей подобного отбора достигается обычно весьма умеренное повышение продуктивности, а дальнейший отбор оказывается неэффективным: с его помощью удается лишь поддерживать продуктивность на достигнутом уровне. При этом в селектируемой популяции сохраняется не только фенотипическая, но и наследственная гетерогенность по селектируемому признаку, т.е. неэффективность отбора не обусловлена отсутствием в популяции наследственных вариантов с повышенной продуктивностью. Такие варианты удается постоянно выделять, но при их последующем размножении в потомстве наблюдается снижение средней продуктивности до исходного уровня. Неэффективность клональной селекции не удалось преодолеть и повышением интенсивности проводимого отбора, например, посредством использования радиоиммунных и флуоресцентных методов (Weller, Zenk, 1979). Это позволяет предположить, что низкая результативность селекции обусловлена наследственной нестабильностью популяций клеток *in vitro* (Orton, 1984). В этой связи заслуживает внимания изучение таких схем селекции, которые бы снижали указанную наследственную нестабильность или препятствовали ее дальнейшему повышению в ходе селекции. Исходя из этих соображений, нами была предложена схема селекции, при которой в культуре ткани раувольфии змеиной предусматривалось не только отбирать варианты с максимальным содержанием индолиновых алкалоидов, но и затем выращивать эти



варианты при измененных условиях культивирования. При этом предпочтительными представлялись условия культивирования, неоптимальные для процесса накопления алкалоидов, поскольку они позволяют выявлять и исключать наиболее нестабильные по продуктивности варианты. В соответствии с этой схемой для контроля эффективности селекции периодически проводили выращивание субкультур при стандартных условиях культивирования. Результаты апробации этой схемы приведены в табл.

В I цикле селекции отбор культур проводился в период конца экспоненциальной - начала стационарной фазы роста, однако это не только не привело к повышению средней продуктивности, но, как показало тестирование в стандартных условиях (VII поколение), среднее содержание алкалоидов заметно упало. Подобное явление отмечено и в работах других исследователей (Николаева и др., 1985). По-видимому, это связано с тем, что начало росту "дочерних" субкультур способны давать только недифференцированные, камбиальные клетки, а на таких сроках селекции в культуре параллельно осуществляется естественный отбор на повышение доли камбиальных элементов, устойчивых к стимуляции дифференцировки и связанным с ней накоплением алкалоидов.

По этим причинам во II и последующих циклах селекции субкультуры тестировали и пересаживали на более ранние сроки, при которых они находились в конце 1-ой половины экспоненциальной фазы роста. Такое изменение методики отбора обеспечило заметное повышение эффективности селекции: во II цикле продуктивность восстановилась до исходного уровня (XII поколение). Повторение циклов селекции привело к существенному изменению динамики роста субкультур и накопления в них алкалоидов. Об этом свидетельствуют данные опытов по изучению динамики роста и накопления алкалоидов отселектированных субкультур при стандартных условиях выращивания (рис.2). Сопоставление характеристик исходного штамма К-20 и отселектированного варианта (рис. 1 и 2) показывает, что отселектированный вариант отличается уменьшением на 5 сут. лаг-фазы роста и сокращением продолжительности роста до перехода в стационарную фазу на 25 сут. Различия в скорости накопления индолиновых алкалоидов были не столь значительны (15 сут), однако отселектированный вариант существенно (в 2 раза) превышал штамм К-20 по среднему содержанию алкалоидов - 2,48% и

1,2% соответственно.

Таблица

Показатели содержания индолиновых алкалоидов, изменчивости и наследуемости этого признака в ходе селекции культуры ткани раувольфии змеиной при разных условиях культивирования

Цикл селек-ции	Покое-отбо-ра	Условия культи-рования	Возраст культу-ры на момент анали-за, сут.	Среднее значе-ние содер-жания индолино-вых алка-лоидов, %	Изменчивость по содержанию			Коэффициент наследуемо-сти ( $h^2$ )
					Lim	S <sup>2</sup>	CV, %	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
	I	Ст.	50	0,78	0,31-1,40	0,044	27	-
	II	5-МТ	37	0,78	0,10-1,70	0,134	47	0,18
	III	Облуч.	53	1,18	0,26-1,92	0,127	30	0,44**
I	IV	Сахар 4%	55	1,06	0,54-1,70	0,050	21	0,38
	V	Гормоны	42	0,09	0,00-0,97	0,038	217	-
	VI	34°C	63	0,52	0,13-1,74	0,080	54	0,08
	VII	Ст.	58	0,43	0,13-1,18	0,048	51	0,02
	VIII	Гормоны	24	0,32	0,18-0,66	0,009	30	0,14
	IX	Сахар 4%	29	0,32	0,08-0,62	0,017	42	0,10
II	X	5-МТ	44	0,72	0,07-2,70	0,360	83	0,02
	XI	Сахар 10%	29	1,19	0,05-1,82	0,215	39	0,20
	XII	Ст.	30	0,83	0,34-2,19	0,152	47	0,42**
	XIII	Сахар 10%	34	0,62	0,36-1,19	0,035	30	0,07
III	XIV	Облуч.	31	0,83	0,29-1,90	0,139	45	0,35**
	XV	34°C	28	0,35	0,10-0,61	0,015	35	0,29
	XVI	Ст.	36	0,84	0,41-1,35	0,051	27	0,58**

## Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	XVII	Сахар 10%	34	0,61	0,36-0,93	0,018	22	0,21
	XVIII	23°C	39	0,95	0,31-1,43	0,098	33	-0,26
IV	XIX	Сахар 4%	28	0,63	0,27-1,10	0,036	30	0,13
	XX	Гормоны	28	0,44	0,13-0,83	0,020	32	0,16**
	XXI	Ст.	33	0,69	0,28-1,27	0,058	35	0,14
V	XXII	Сахар 10%	33	0,74	0,38-1,13	0,016	17	0,12**
	XXIII	Ст.	35	1,09	0,47-1,34	0,038	18	0,07**
VI	XXIV	23°C	38	1,04	0,44-1,48	0,042	20	0,07
	XXV	Ст.	32	1,10	0,47-1,90	0,075	25	0,13**

\* Расшифровка условий культивирования: Ст. - стандартные условия, 5-МГ-выращивание на питательной среде с 5-метилтриптофаном; облуч. - предварительное гамма-облучение субкультур; сахар 4%-питательная среда с 4% сахарозы; сахар 10%-питательная среда с 10% сахарозы; гормоны-питательная среда с фитогормонами; 34°C-культивирование при 34°C; 23°C-культивирование при 23°C.

\*\* Статистически значимые коэффициенты наследуемости ( $h^2$ ) при уровне значимости 0,05.

Полученные различия в динамике роста, по-видимому, объясняются спонтанным отбором в пользу вариантов, способных быстрее завершить процесс роста и встать на путь терминальной дифференцировки, степень которой определяет уровень накопления алкалоидов. Селекции быстрорастущих субкультур способствовал перенос их тестирования и пересадок на более ранние сроки. Достаточно выраженные изменения в характеристиках отселектированного варианта позволяют сделать вывод не только об эффективности использованной нами схемы "циклической" селекции, но и рассматривать отселектированный вариант как новый субштамм- продуцент, представляющий интерес для

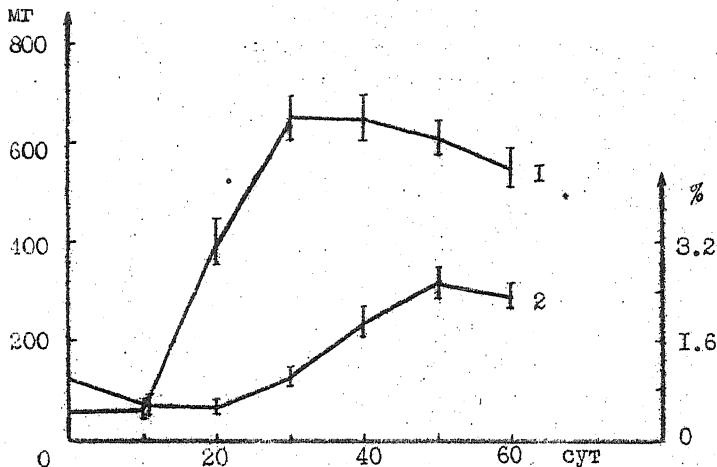


Рис.2. Динамика роста /I/ культуры ткани отселектированного субштамма раувольфии змеиной и накопление в ней индолиновых алкалоидов /2/.

Обозначения те же, что и на рис.1.

промышленного получения аймалина и других индолиновых алкалоидов.

В процессе селекции нами одновременно определялся характер изменчивости субкультур по содержанию индолиновых алкалоидов при разных условиях культивирования. Примеры наиболее характерных распределений приведены на рис. 3 и 4.

Представленные гистограммы свидетельствуют, что условия культивирования существенным образом влияли не только на средние значения содержания алкалоидов в субкультурах, но и на характер их распределения по этому признаку. В стандартных условиях (рис.3а), при изменении концентрации сахарозы в питательной среде, выращивании при  $23^{\circ}\text{C}$  (рис.3б) и при гамма-облучении субкультур перед посадкой в дозе 10-15 Гр (рис.3в) характер распределений существенно не отличался от нормального. На питательной среде с фитогормонами или при  $34^{\circ}\text{C}$  распределения становились асимметричными за счет увеличенной в большей или меньшей степени доли низкопродуктивных вариантов (рис.4а,б).

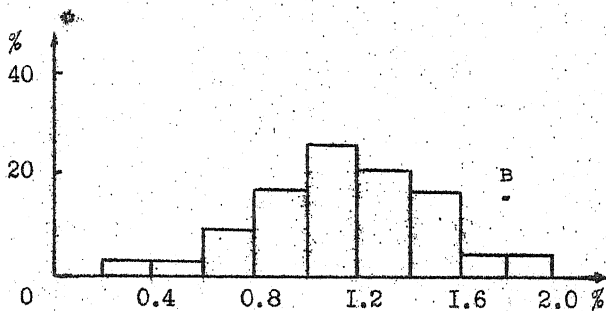
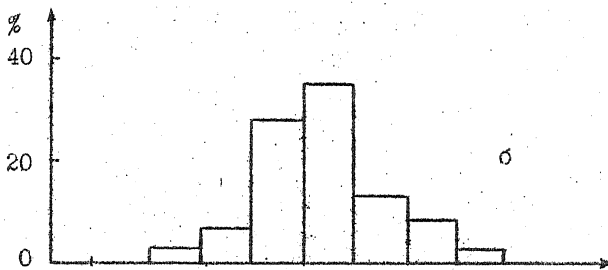
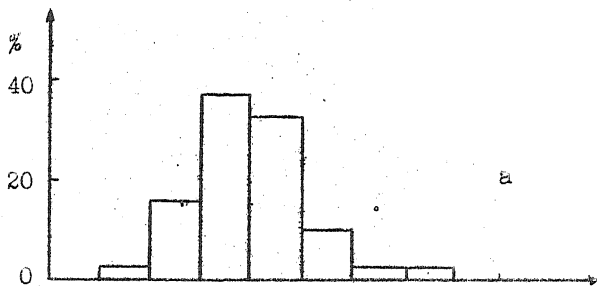


Рис.3. Гистограммы распределения субкультур раувальфии змеиной по содержанию индолиновых алкалоидов при разных условиях выращивания. а - стандартные условия; б - выращивание при 23 С; в - выращивание предварительно облученных субкультур. По осям абсцисс - содержание индолиновых алкалоидов, %; по осям ординат - доля субкультур, %.

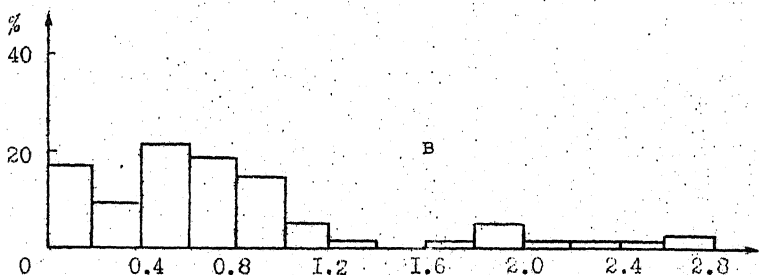
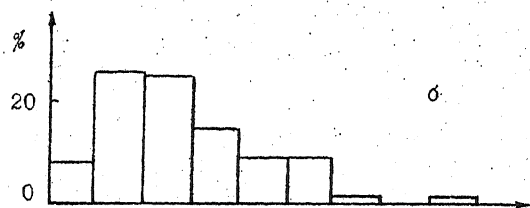
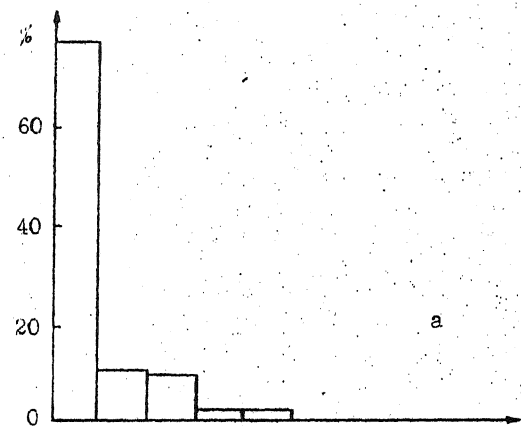


Рис.4. Гистограммы распределения субкультур раувольфии змеиной по содержанию индолиновых алкалоидов при разных условиях выращивания. а - среда с фитогормонами; б - выращивание при 34 С; в - среда с 5-метилтриптофаном.

Остальные обозначения те же, что и на рис.3.

Наибольшее усиление размаха изменчивости наблюдалось на среде с 5-метилтриптофаном, при этом в распределении можно было отметить признаки двугоршинности (рис.4в).

Следует отметить, что в большинстве случаев полученные нами данные подтверждают известное положение об относительном антагонизме процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Во всех случаях, когда условия культивирования стимулировали прирост биомассы субкультур (среды с 10% сахарозы, фитогормонами, температура 34° С), наблюдалось понижение среднего содержания алкалоидов.

Как известно, на среде с 5-метилтриптофаном выживают только клетки, способные синтезировать большое количество свободного триптофана-предшественника индолиновых алкалоидов (Sasse et al., 1983). По-видимому, лишь специфическая фракция подобных клеток способна трансформировать избыток свободного триптофана в алкалоиды, что и обуславливает характер правой части распределения на рис.4в. Последующее культивирование показало, однако, что эти высокопродуктивные варианты оказались в большинстве наследственно нестабильными: через 3 поколения отбора среднее содержание алкалоидов снизилось до исходного уровня.

Резко асимметричный характер распределения на среде с фитогормонами (рис.4а) обеспечил эффективность "негативной" селекции в этих условиях, т.е. массовую отбраковку вариантов с очень низкой продуктивностью. Об этом свидетельствует постоянное увеличение среднего содержания алкалоидов на среде с гормонами в ходе селекции (см. IV, VIII и X поколения отбора, таблица).

Особое влияние на содержание индолиновых алкалоидов в культуре оказывало гамма-облучение. Методами математического планирования и путем построения математических модели было изучено влияние различных доз гамма-облучения на рост культуры и ее продуктивность и изменение этого влияния при облучении в различные фазы роста. Оказалось, что облучение культуры в момент пересадки в дозе 10-20 Гр приводит к значительному увеличению содержания в культуре индолиновых алкалоидов к 70-75 сут. роста (рис.5). Такое влияние можно, по-видимому, объяснить способностью небольших доз ионизирующего излучения стимулировать цитодифференцировку и органогенез (Macdonald, 1986). Несмотря на некоторое замедление темпов роста субкультур при облучении в

момент пересадки в дозе 10-20 Гр, двукратное увеличение содержания индолиновых алкалоидов через 70 сут роста делает перспективным применение стимулирующих доз гамма-облучения для увеличения продуктивности культуры при ее промышленном выращивании.

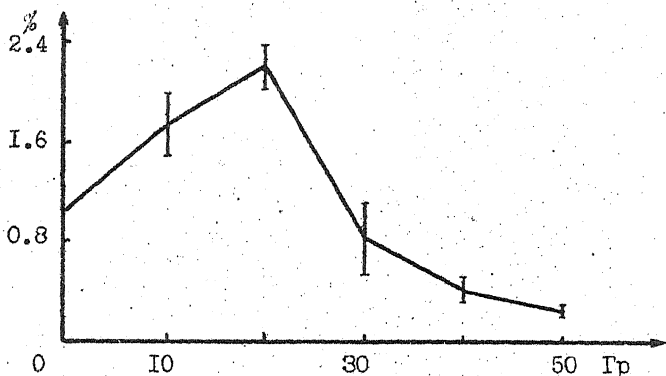


Рис.5. Содержание индолиновых алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной через 70 сут роста при облучении в момент пересадки различными дозами гамма-излучения.

По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - содержание индолиновых алкалоидов, %.

Следует отметить, что в литературе приводится, как правило, лишь среднее содержание вторичных метаболитов в культурах растительных клеток, в том числе и в популяции клеток раувольфии (Каукова, 1982; Алхимова, 1990 и др.), при разных условиях культивирования и что практически отсутствует информация о влиянии условий культивирования на характер распределения соматоклонов и субкультур по признаку "содержание вторичных метаболитов". Вместе с тем, такая информация является существенной при выборе как соответствующей схемы селекции, так и оптимальных для реализации продуктивности условий выращивания.

При проведении селекции по указанной выше схеме в каждом поколении отбора вычислялись коэффициенты наследуемости ( $h^2$ ), признака "содержание индолиновых алкалоидов". Ошибка определения



величины  $h^2$  обычно весьма велика (Глатов и др., 1982), что не позволяло сравнивать величины  $h^2$  на разных этапах селекции между собой. Статистически достоверные величины  $h^2$  чаще встречались на заключительном этапе селекции (см. таблицу). Однако при этом не наблюдалось тенденции к снижению общей фенотипической вариабильности. Полученные нами данные не позволяют сделать вывод о том, изменялась ли в ходе селекции наследственная нестабильность в популяции клеток раувольфии змеиной. Для получения подобной информации потребуются разработка методов определения наследственной и фенотипической вариабильности в популяциях культивируемых клеток растений, включая методы анализа ковариансы генотип-среда.

В целом, проведенные нами исследования показывают, что генетические основы селекции клеточных штаммов-продуцентов до настоящего времени остаются недостаточно разработанными. Имеющиеся методы определения вклада наследственных факторов в общую фенотипическую вариабильность селективируемого признака являются недостаточными для точного прогнозирования эффективности проводящегося искусственного отбора. Сделанная нами попытка применить схему "циклической" селекции для повышения эффективности отбора дала положительный результат. По-видимому, перспективной является и разработка способов снижения наследственной нестабильности в популяции культивируемых клеток для успешной селекции новых клеточных штаммов-продуцентов.

## ВЫВОДЫ

1. Предложена и исследована схема "циклической селекции", при которой отбор вариантов с наибольшей продуктивностью сопровождается постоянным изменением условий культивирования в пределах каждого цикла селекции, а изменения условий культивирования в разных циклах могут совпадать. Для изменения условий культивирования применяли варьирование в питательной среде концентраций сахарозы, добавление в среду фитогормонов и 5-метилтриптофана, применяли гамма-облучение субкультур и выращивание при изменении температуры культивирования.

2. Селекция, включавшая 25 повторностей (6 циклов) отбора, оказалась эффективной: при выращивании в стандартных условиях ростовой цикл отселектированных вариантов сократился на 20-25 сут, а среднее содержание индолиновых алкалоидов повысилось в 2 раза (с 1,2% до 2,48%). Это позволяет рассматривать полученный вариант как новый субштамм, перспективный для промышленного использования в качестве источника аймалина и других индолиновых алкалоидов.

3. Селекция по предложенной схеме была эффективной при отборе субкультур раувольфии в первую половину экспоненциальной фазы роста и неэффективна при отборе в конце экспоненциальной и в стационарную фазу роста.

4. Показано, что условия культивирования могут влиять не только на средние и модальные значения содержания индолиновых алкалоидов в культуре раувольфии, но и на характер фенотипического разнообразия субкультур по селективируемому признаку.

5. С помощью методов математического моделирования описано влияние гамма-облучения в диапазоне доз 0-50 Гр в различные стадии ростового цикла на процесс роста культуры и накопления в ней индолиновых алкалоидов. Обнаружено стимулирующее проявление накопления алкалоидов воздействием гамма-облучения в дозе 10-25 Гр в момент посадки культуры.

6. С помощью однофакторного дисперсионного анализа определены значения коэффициента наследуемости признака "содержание индолиновых алкалоидов" ( $h^2$ ) при разных условиях культивирования и на разных этапах отбора. Статистически достоверные величины  $h^2$

во второй половине селекционного процесса встречаются не реже, чем в первой половине. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении не только фенотипической, но и наследственной гетерогенности популяции.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шепелев В.Н., Вахтин Ю.Б. Влияние гамма-облучения на фенотипическую гетерогенность каллусной культуры ткани раувольфии змеиной // В кн.: Всесоюзная конференция по генетике соматических клеток в культуре (Звенигород, 19-22 октября 1986 г.). Тезисы докладов. - М., 1986. - С.131.

2. Шепелев В.Н. Наследуемость признака "содержание аймалина" в культуре ткани раувольфии змеиной при изменении условий культивирования // В кн.: V съезд ВОГиС им.Н.И.Вавилова (Москва, 24-28 ноября 1987 г.). Тезисы докладов.-М., 1987. - Т.1.- С.306.

3. Шепелев В.Н. Соматоклональная изменчивость культуры ткани раувольфии змеиной при различных условиях культивирования // В кн.: Матер.научн.конф.молодых ученых. ИНЦ (Л., 31 марта-2 апреля 1987 г.). - Л., 1987. - С.82-87.

4. Шепелев В.Н. Генетические основы селекции растительных штаммов продуцентов // В кн.: III Всесоюзная конференция молодых ученых по физиологии растительной клетки (Петрозаводск, 18-22 апреля 1988 г.). Тезисы докладов. - М., 1988.-С.100.

5. Шепелев В.Н. Влияние гамма-облучения на рост и накопление алкалоидов в культуре ткани раувольфии змеиной // В кн.: I Всесоюзный радиобиологический съезд (Москва, 21-27 августа 1989 г.). Тезисы докладов.-Пушино, 1989. - Т.2. 2 С.320-321.

6. Шепелев В.Н., Вахтин Ю.Б., Николаева Л.А., Кунах В.А. Способ выращивания культуры ткани раувольфии змеиной - продуцента аймалина // А.с.СССР №1387402 от 08.12.87.

7. Губарь С.М., Лазуркевич З.В., Константинова Е.П., Кунах В.А., Воллосович А.Г., Шепелев В.Н. Способ культивирования штамма культуры ткани Rauwolfia K-20-продуцента аймалина // А.с.СССР № 1482190 от 22.01.89.

РТИ. Тип. ВПР. Зак. \_\_\_\_\_ . ДСП.

Тип. 100. \_\_\_\_\_ Бесплатно

РП. Тип. ВПР. Зак. 28. Тир. 100. 1. 08. 90. Бесплатно.