

Динаміка клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. за різних умов культивування *in vitro*

І. Ю. Парнікоза, Н. Ю. Мірюта¹, Ю. Ал-Аммурі¹, В. А Кунах¹

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна,

kunakh@imbg.org.ua

Досліджено динаміку клітинних популяцій високопродуктивного штаму K-27 R. serpentina – продуцента протіаритмічного алкалоїду аймаліну – за різних умов вирощування (поверхневе, глибинне) на середовищах з неоднаковим вмістом сахарози та мінеральних компонентів. Вивчали зміну чисельності клітин за відносним вмістом ДНК та площею ядра, а також залежність питомих швидкостей показників продуктивності (накопичення біомаси та індолінових алкалоїдів) від внеску динаміки окремих субпопуляцій клітин. Проаналізовано особливості мінливості структури клітинних популяцій за обома показниками в різних умовах вирощування. Для їхнього опису використано термодинамічний підхід, який полягає у визначенні методом парної лінійної регресії особливостей зміни потоків накопичення біомаси, трахеїд та алкалоїдів залежно від внеску біологічних сил – динаміки субпопуляцій клітин з різним відносним вмістом ДНК та площею ядра.

Ключові слова: культура тканин рослин, *Rauwolfia serpentina*, динаміка клітинних популяцій *in vitro*.

Вступ. Головною особливістю популяцій культивованих клітин є їхня висока поліморфність і мінливість на цитоморфологічному, цитогенетичному та молекулярно-біологічному рівнях. Конкретні чинники та особливості цієї мінливості досить різноманітні [1]. Так, у тканинних культурах спостерігається велика гетерогенність за плоідністю [1, 2], пов'язаною з диференціацією клітин, зокрема, зі здатністю їх до продукування біологічно активних речовин. Багаторічне дослідження культури тканин цінної лікарської рослини раувольфії зміїної (*R. serpentina* Benth.) – джерела важливих для медицини індолінових алкалоїдів виявило наявність широкого діапазону варіювання плоідності клітин і, отже, існування певного набору субпопуляцій клітин за цією озна-

кою. Співвідношення між окремими субпопуляціями залежно від впливу зовнішніх чинників, зокрема, варіацій умов вирощування може змінюватися [1].

Метою представленої роботи було вивчити динаміку структури клітинної популяції тривало культивованого високопродуктивного штаму K-27 *R. serpentina* за показниками відносного вмісту ДНК та площі ядра, пов'язаними з диференціюванням та біосинтетичною активністю відповідно, а також залежність питомих швидкостей показників продуктивності від внеску динаміки окремих субпопуляцій клітин за зміни умов культивування.

Матеріали і методи. *Об'єкт дослідження.* Вивчали генетично стабільний протягом більш ніж 15 років вирощування (понад 150 пасажів) штам K-27 *R. serpentina* за стандартних умов культиву-

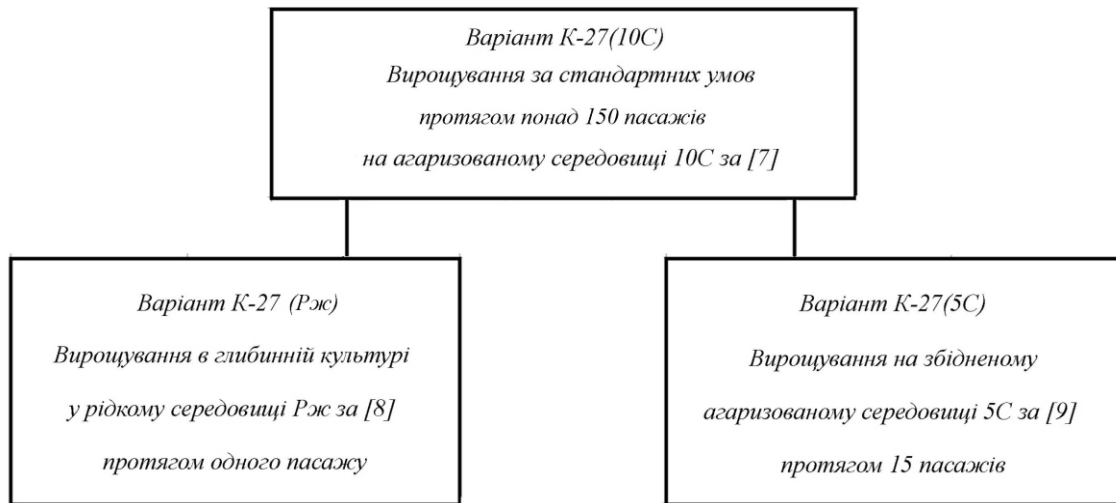


Рис. 1. Схема дослідів із змін умов вирощування штаму К-27 культури *Rauwolfia serpentina*

вання на агаризованому середовищі з 10 % сахарози – К-27 (10С), детально описаний в роботах [1, 3, 4], а також інші варіанти його вирощування, що відрізняються способом культивування, вмістом сахарози та макро- і мікросолей у живильному середовищі (див. [7–9]) (рис. 1). Варіант безпосереднього перенесення тканини штаму К-27 (10С) в умови глибинного вирощування у рідкому середовищі Рж з 2,5 % сахарози – К-27 (Рж) – є рекомендованим для промислового вирощування [10]. Клітини цього варіанта зазнають фізіологічного стресу внаслідок змін способу вирощування та вмісту сахарози і солей у живильному середовищі. Варіант поверхневого вирощування штаму К-27 на агаризованому середовищі з 5 % сахарози – К-27 (5С) – є найкомфортнішим для штаму за живильним середовищем (зниження глікемічного стресу), але в той же час недостатньо стійким до пересадок. Проміжне культивування на середовищі 5С сприяє збереженню продуктивності при перенесенні тканини штаму зі стандартних (лабораторних) у промислові умови глибинного вирощування в рідкому середовищі Рж [5].

Відносний вміст ДНК (ввДНК) та площу ядерця вивчали в інтерфазних клітинах, що дозволяє охопити більшу частину популяції [11]. Для отримання динаміки кількісного складу субпопуляцій клітин за ввДНК та площею ядерця ці показники досліджували щодоби протягом 60 діб пасажу в ядрах інтерфазних клітин методами забарвлення за Фьольге-

ном та імпрегнації сріблом відповідно, як описано раніше [12–14]. Для денситометрії застосовано оптичну систему, яка складається із зеленого світлофільтра мікроскопа NU-2E («Carl Zeiss», Австрія), червоного світлофільтра цифрової камери CCD Sac-410 PA, відеодрайвера Asus V 3000. Щільність засвітки в пікселях вимірювали на цифрових фотографіях відносно забарвленої за Фьольге-ном анафазі за допомогою програми Scion Image. Площу ядерця визначали з фотографій, використовуючи програму Photopaint [13].

Визначення продуктивності. Відповідно до [15], біологічні потоки в нашому випадку являють собою динаміку питомої швидкості накопичення сухої біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів. Криві динаміки питомої швидкості накопичення сухої біомаси та індолінових алкалоїдів будували на основі знаходження середньої величини сухої біомаси та вмісту алкалоїдів за [6] у 3–5 пробах на кожну п'яту добу пасажу кожного варіанта культивування, чисельного диференціювання за методом кінцевих різниць та ділення отриманих значень на значення маси в даній точці [13, 16]. Питому швидкість накопичення трахеїд отримували, грунтуючись на щодобовому аналізі 5000 клітин на чотирьох забарвлених ацетоорсеїном тимчасових препаратів, як описано в роботі [13].

Математична обробка. За визначенням [15] та на основі аналізу раніше отриманих експериментальних даних [13], біологічні сили являють собою

Таблиця 1

Розмір та частка в загальній популяції клітин окремих класів за відносним вмістом ДНК у ядрі клітин різних варіантів культивування штаму K-27 *R. serpentina*

Відносний вміст ДНК в ядрі, С	Частка		
	К-27 (10С)	К-27 (5С)	К-27 (Рж)
<i>Перша субпопуляція</i>			
<1	0,0016	0,0159	0,0007
1–2,99	0,4575	0,6005	0,2349
<i>Друга субпопуляція</i>			
3–4,99	0,4320	0,3063	0,5090
5–6,99	0,0905	0,0632	0,1990
7–8,99	0,0127	0,0122	0,0407
9–10,99	0,0050	0,0017	0,0112
>11	0,0005	0,0002	0,0042

П р и м і т к а. Жирним шрифтом виділено морфометричні класи, згруповані в субпопуляції.

динаміку частки клітин окремих субпопуляцій за значенням ввДНК та площею ядра (отриманих внаслідок групування морфометричних класів за кожною ознакою на підставі наявності коефіцієнтів кореляції з динамікою кожного з таких показників продуктивності, як питома швидкість накопичення сухої біомаси, індолінових алкалоїдів, а також трахеїд) (табл. 1, 2, рис. 2). Для визначення феноменологічних коефіцієнтів досліджували наявність лінійної залежності та коефіцієнти кореляції між динамікою субпопуляції та питомою швидкістю конкретного показника продуктивності, які знаходили методом парної лінійної регресії згідно з [13]. Зауважимо, що у зв'язку з часовою гетерогенністю динаміки показників продуктивності (дві часові складові) у варіантів К-27 (10С) та К-27 (Рж) пошук кореляційних залежностей проводили для кожної складової окремо, для варіанта К-27 (5С) динаміка питомих швидкостей усіх показників продуктивності протягом пасажу вкладається в одну часову складову. Подальшу обробку проводили із застосуванням методів термодинамічного підходу, як описано в роботі [13].

Результати і обговорення. За стандартних умов культивування штаму К-27 на 30-ту добу накопичував 30 г/л сухої біомаси. Концентрація

Таблиця 2

Розмір та частка в загальній популяції клітин окремих класів за площею ядра у ядрі клітин різних варіантів культивування штаму K-27 *R. serpentina*

Площа ядра, мкм ²	Частка		
	К-27(10С)	К-27(10С)	К-27(10С)
<i>Перша субпопуляція</i>			
< 0,99	–	0,0027	0,0005
1–1,99	–	0,0632	0,0084
2–2,99	–	0,1937	0,0479
3–3,99	0,017	0,2205	0,0953
4–4,99	0,029	0,1710	0,1253
<i>Друга субпопуляція</i>			
5–5,99	0,060	0,1280	0,1340
6–6,99	0,087	0,0771	0,1156
7–7,99	0,097	0,0532	0,0921
8–8,99	0,102	0,0310	0,0695
9–9,99	0,094	0,0232	0,0551
10–10,99	0,096	0,0366	0,2563
<i>Третя субпопуляція</i>			
11–11,99	0,077	–	–
12–12,99	0,058	–	–
13–13,99	0,047	–	–
14–14,99	0,040	–	–
15–15,99	0,038	–	–
16–16,99	0,023	–	–
<i>Четверта субпопуляція</i>			
17–17,99	0,019	–	–
18–18,99	0,017	–	–

П р и м і т к а. Жирним шрифтом виділено морфометричні класи, згруповані в субпопуляції.

індолінових алкалоїдів становила на 20-ту добу росту – 150, на 30-ту – 200, а на 49-ту – 250 мг/л. На відміну від нього варіант К-27 (5С) мав єдиний пік на 60-ту добу росту, а саме – 45 г/л сухої біомаси та 400 мг/л індолінових алкалоїдів. При перенесенні штаму К-27 в умови глибинного вирощування на середовищі Рж варіант К-27 (Рж) вже на 17-ту добу

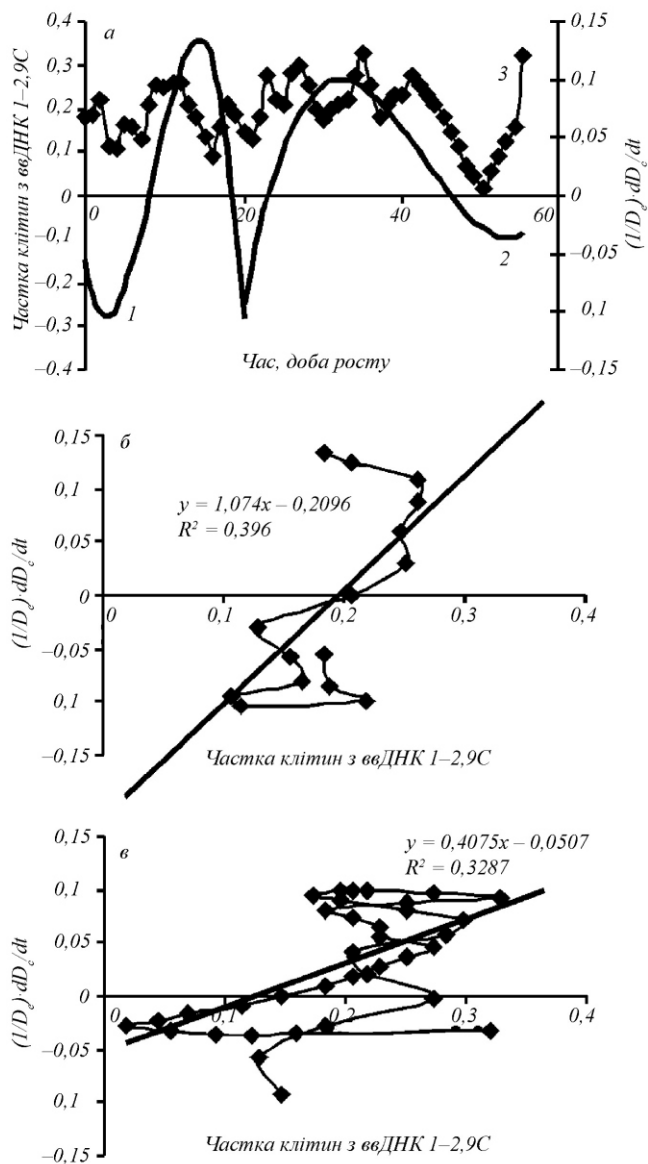


Рис. 2. Динаміка питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів $(1/D_c)(dD_c/dt)$ (1 – перша складова; 2 – друга складова); 3 – динаміка частки клітин з ввДНК 1–2,99С в ядрі протягом пасажу варіанта культивування К-27 (10С) *R. serpentina* за стандартних умов вирощування на 10С (а); залежність першої складової $(1/D_c)(dD_c/dt)$ від частки клітин з ввДНК 1–2,99С (б); залежність другої складової $(1/D_c)(dD_c/dt)$ від частки клітин з ввДНК 1–2,99С (в). На графіках б та в подано рівняння прямих, проведених методом найменших квадратів та квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції. Значення критеріальної статистики для величин R^2 , наведених на графіках б ($F_{1,13} = 8,52$) та в ($F_{1,33} = 16,66$), перевищують значення верхньої 5%-ї межі F -розподілу для $N = 15$ ($F_{1,13} = 4,67$) та для $N = 35$ ($F_{1,33} = 4,17$), що означає наявність лінійної залежності

характеризувався максимумом накопичення сухої біомаси – 12 г/л, перший пік алкалоїдів – 55 мг/л спостерігали також на 17-ту добу росту. Максимум же за цим показником (65 мг/л) відмічено на 30-ту добу росту.

Середній індекс трахеїд у досліджених варіантів сильно коливався: від 2,5 % у К-27 (10С) і 3,2 % у К-27 (5С) до 8,4 % у К-27 (Рж). Таким чином, останньому варіанту притаманний найвищий рівень накопичення трахеїд.

Під структурою популяції будемо розуміти надалі кількісний склад субпопуляцій клітин з певним значенням ввДНК або площі ядра; динаміку кількості клітин з певними ознаками далі називатимемо скорочено динамікою субпопуляцій. Внесок кожної субпопуляції за ввДНК ($j = 3$) чи за площею ядра ($j = 6$) у потік накопичення біомаси, алкалоїдів та трахеїд в загальному вигляді відбиває система феноменологічних рівнянь:

$$I_g(j) \quad R_{gg} A_{gg} k_{gg} X_g(j) \quad R_{gd_1} A_{gd_1} k_{gd_1} X_{d_1}(j)$$

$$R_{gd_c} A_{gd_c} k_{gd_c} X_{d_c}(j);$$

$$I_{d_1}(j) \quad R_{d_1g} A_{d_1g} k_{d_1g} X_g(j) \quad R_{d_1d_1} A_{d_1d_1} k_{d_1d_1} X_{d_1}(j)$$

$$R_{d_1d_c} A_{d_1d_c} k_{d_1d_c} X_{d_c}(j);$$

$$I_{d_c}(j) \quad R_{d_cg} A_{d_cg} k_{d_cg} X_g(j) \quad R_{d_cd_1} A_{d_cd_1} k_{d_cd_1} X_{d_1}(j)$$

$$R_{d_cd_c} A_{d_cd_c} k_{d_cd_c} X_{d_c}(j),$$

де I_g – потік біомаси; I_{d_1} – потік трахеїд; I_{d_c} – потік алкалоїдів; конкретне значення та знак коефіцієнта кореляції (R_{mn} , де $m = g, d_1, d_c$; $n = g, d_1, d_c$) свідчать про внесок конкретної динаміки субпопуляції (термодинамічної сили) $X_g(j)$, $X_{d_1}(j)$ чи $X_{d_c}(j)$ за ввДНК ($j = 3$) та площею ядра ($j = 6$) у відповідний біологічний потік; A_{mn} (де $m = g, d_1, d_c$; $n = g, d_1, d_c$) – коефіцієнти адаптації; k_{mn} (де $m = g, d_1, d_c$; $n = g, d_1, d_c$) – коефіцієнт розмірності [15, 17], конкретні числові значення для кожної з досліджених систем представлено в табл. 3 та на рис. 3.

Характеристика структури субпопуляцій за відносним вмістом ДНК. Значення ввДНК в ядрах клітин коливалися в широких межах від менше 1С

Таблиця 3

Феноменологічні коефіцієнти L_{mn} ($L_{mn} = R_{mn} A_{mn}$) та їхні множники (коефіцієнти кореляції R_{mn} і адаптації A_{mn}) та коефіцієнти розмірності k_{mn} для кожного з потоків: сухої біомаси ($m = g$), індолінових алкалоїдів ($m = d_i$), трахеїд ($m = d_c$) для конкретної сили (динаміки субпопуляції) з відносним вмістом ДНК та площею ядра різних варіантів вироцунвання штаму *K-27 R. serpentina*

Штам	R_{gn}	$R_{d_i n}$	$R_{d_c n}$	A_{gn}	$A_{d_i n}$	$A_{d_c n}$	L_{gn}	$L_{d_i n}$	$L_{d_c n}$	k_{mn}
<i>K-27 (10C)</i>										
Перша складова	Відносний вміст ДНК, С									
	3–6,9	3–6,9	1–2,9	3–6,9	3–6,9	1–2,9	3–6,9	3–6,9	1–2,9	
$n = g$	0,58	0,65	–0,67	1	1	1	0,58	0,65	–0,67	1
$n = d_i$	0,65	0,54	–0,56	2	3,52	2	1,30	1,90	–1,12	10^{-1}
$n = d_c$	–0,67	–0,56	0,63	2,5	2,5	10,3	–1,68	–1,4	6,49	10^{-3}
	Площа ядра, $\mu\text{м}^2$									
	>17	>17	12–16,9	>17	>17	12–16,9	>17	>17	12–16,9	
$n = g$	0,66	–0,67	0,48	1	1	1	0,66	–0,67	0,48	1
$n = d_i$	0,67	0,68	0,79	2	3,52	2	1,34	2,39	1,58	10^{-1}
$n = d_c$	–0,48	–0,79	0,78	2,5	2,5	10,3	–1,2	–1,98	8,03	10^{-3}
Друга складова	Відносний вміст ДНК, С									
–	1–2,9	3–6,9	1–2,9	1–2,9	3–6,9	1–2,9	1–2,9	3–6,9	1–2,9	
$n = g$	0,49	–0,82	0,65	1	1	1	0,49	–0,82	0,65	1
$n = d_i$	–0,82	0,71	–0,54	2	3,52	2	–2,52	2,50	–1,08	10^{-1}
$n = d_c$	–0,65	–0,54	0,57	1	1	4,1	–0,65	–0,54	2,34	10^{-3}
	Площа ядра, $\mu\text{м}^2$									
	<10,9	<10,9	12–16,9	<10,9	<10,9	12–16,9	<10,9	<10,9	12–16,9	
$n = g$	0,87	–0,55	–0,92	1	1	1	0,87	–0,55	–0,92	1
$n = d_i$	–0,55	0,99	–0,93	2	3,52	2	–1,10	3,48	–1,86	10^{-1}
$n = d_c$	–0,92	0,93	0,77	1	1	4,1	–0,92	0,93	3,13	10^{-3}
<i>K-27 (Ржс)</i>										
Перша складова	Відносний вміст ДНК, С									
	1–2,9	3–8,9	3–8,9	1–2,9	3–8,9	3–8,9	1–2,9	3–8,9	3–8,9	
$n = g$	0,67	–0,79	–0,70	1	1	1	0,67	–0,79	–0,70	1
$n = d_i$	–0,79	0,76	–0,68	3	5,28	3	–2,37	4,01	–2,04	10^{-1}
$n = d_c$	–0,70	–0,68	0,67	0,75	0,75	3,1	–0,53	–0,51	2,08	10^{-3}
	Площа ядра, $\mu\text{м}^2$									
	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	
$n = g$	0,60	–0,55	–0,60	1	1	1	0,60	–0,55	–0,60	1
$n = d_i$	–0,55	0,76	–0,75	3	5,28	3	–1,65	4,01	–2,25	10^{-1}
$n = d_c$	–0,60	–0,75	0,59	0,75	0,75	3,1	–0,45	–0,56	1,83	10^{-3}

Закінчення табл. 3

Штам	R_{gn}	$R_{d,n}$	$R_{d,n}$	A_{gn}	$A_{d,n}$	$A_{d,n}$	L_{gn}	$L_{d,n}$	$L_{d,n}$	k_{min}
<i>К-27 (Рж)</i>										
Друга складова										
<i>Відносний вміст ДНК, С</i>										
	3–8,9	3–8,9	1–2,9	3–8,9	3–8,9	1–2,9	3–8,9	3–8,9	1–2,9	
$n = g$	0,58	-0,51	-0,53	1	1	1	0,58	-0,51	-0,53	1
$n = d_t$	-0,51	0,46	-0,49	3	5,28	3	-1,53	2,43	-1,47	10^{-1}
$n = d_c$	-0,53	-0,49	0,61	0,25	0,25	1,03	-0,13	-0,12	0,63	10^{-3}
<i>Площа ядра, мкм²</i>										
	2–4,9	>8	>8	2–4,9	>8	>8	2–4,9	>8	>8	
$n = g$	0,56	-0,59	-0,62	1	1	1	0,56	-0,59	-0,62	1
$n = d_t$	-0,59	0,64	-0,75	3	5,28	3	-1,77	3,38	-2,25	10^{-1}
$n = d_c$	-0,62	-0,75	0,60	0,25	0,25	1,03	-0,13	-0,12	0,63	10^{-3}
<i>К-27(5С)</i>										
<i>Відносний вміст ДНК, С</i>										
	1–2,9	1–2,9	3–6,9	1–2,9	1–2,9	3–6,9	1–2,9	1–2,9	3–6,9	
$n = g$	0,83	0,77	-0,65	1	1	1	0,83	0,77	-0,65	1
$n = d_t$	0,77	0,75	-0,58	1	1,76	1	0,77	1,33	-0,58	10^{-1}
$n = d_c$	-0,65	0,58	0,64	0,6	0,6	2,21	-0,39	0,35	1,41	10^{-3}
<i>Площа ядра, мкм²</i>										
	<4	<4	>5	<4	<4	>5	<4	<4	>5	
$n = g$	0,61	0,84	0,64	1	1	1	0,61	0,84	0,64	1
$n = d_t$	-0,84	0,88	-0,82	1	1,76	1	-0,84	1,56	-0,82	10^{-1}
$n = d_c$	-0,64	0,82	0,72	0,6	0,6	2,21	-0,38	-0,49	1,59	10^{-3}

до понад 11 С. З найвищою частотою зустрічалися клітини із значеннями, близькими до 2С та 4С (табл. 1). В усіх варіантах виявлено дві субпопуляції з невеликим домінуванням клітин з 3–6,9С (частка 0,53) у К-27 (10С) та переважанням однієї з субпопуляцій у К-27(5С) – 1–2,9С (частка 0,60) та в К-27 (Рж) – 3–8,9С (частка 0,75).

З даних табл. 3 видно, що динаміка субпопуляції з ввДНК 1,0–2,9С робить позитивний внесок у першу складову потоку біомаси у варіантах К-27 (5С) та К-27 (Рж), та негативний – у вихідного штаму К-27 (10С) за стандартних умов вирощування. Внесок динаміки субпопуляції 3–8,9С в усіх

варіантів протилежний такій з вмістом ДНК близько 2С. Це може бути пов'язано з їхнім одночасним позитивним внеском у динаміку потоку накопичення алкалоїдів.

Для другої складової потоку біомаси у варіанті К-27 (10С) динаміка обох субпопуляцій клітин порівняно з першою складовою змінює знак внеску на протилежний. У варіанта К-27 (Рж) на другій складовій потоку біомаси внесок динаміки не змінює знака лише частини субпопуляції клітин із вмістом ДНК 3–8,9С; динамік другої частини цієї ж субпопуляції та субпопуляції 1–2,9С змінює знак внеску на протилежний.

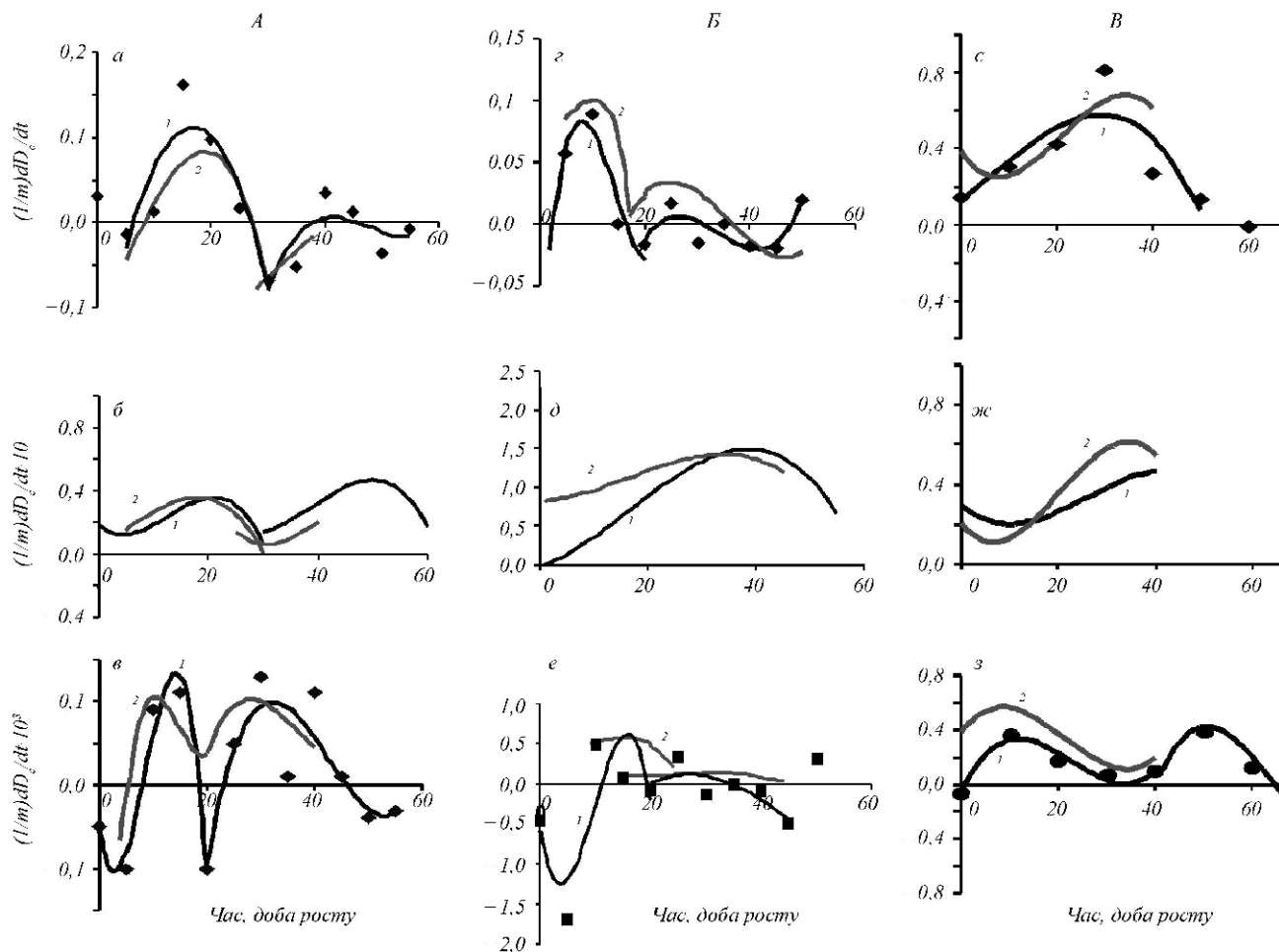


Рис. 3. Динаміка питомої швидкості зміни деяких характеристик протягом пасажу в культурі тканин раувольфії зміної за різних умов вирощування: А – варіант К-27 (10С); Б – варіант К-27 (Рж); В – варіант К-27 (5С): а, з, в – накопичення сухої біомаси $((1/m)dm/dt - \text{потік } I_g)$ (1 – потік I_g , визначений з експерименту; 2 – $(I_g(3) + I_g(6))/2$); б, д, ж – накопичення трахеїд $((1/m)dD/dt \cdot 10 - \text{потік } I_d)$ (1 – потік I_d , визначений з експерименту; 2 – $(I_d(3) + I_d(6))/2$); в, е, з – накопичення індолінових алкалоїдів $((1/m)dD_i/dt \cdot 10^3 - \text{потік } I_{d_i})$ (1 – потік I_{d_i} , визначений з експерименту; 2 – $(I_{d_i}(3) + I_{d_i}(6))/2$). Всі дані згладжено поліномами 3-го ступеня для потоків, отриманих з експерименту: біохімічного та цитологічного вивчення (крива 1) та на основі врахування внесків усіх субпопуляцій клітин за відносним вмістом ДНК та площею ядра (крива 2)

Порівняння внесків динаміки досліджених субпопуляцій у потік алкалоїдів на першій та другій складовій показує, що в другому випадку у варіанта К-27 (10С) динаміка субпопуляції клітин, що містять 1–2,9С ДНК частково переорієнтовується на позитивний внесок, тоді як динаміка субпопуляції клітин 3–6,9С залишає знак свого внеску негативним. У К-27 (Рж) на другому часовому проміжку спостерігали протилежний першому внесок динаміки субпопуляції клітин 1–2,9 С, а субпопуляція 3–8,9С поділяється на дві частини, одна з яких змінює знак внеску її динаміки на протилеж-

ний при переході від першої складової до другої у потік накопичення алкалоїдів.

На першій складовій динаміки потоку трахеїд у варіанті К-27 (10С) відмічено позитивний внесок динаміки субпопуляції клітин з ввДНК 3–6,9С та негативний – 1–2,9С. У К-27 (5С) знаки внесків були протилежні властивим варіанту К-27 (10С), а в К-27 (Рж) негативний внесок притаманний динаміці субпопуляції 1–2,9С (у чому його відмінність від К-27 (5С)), а також динаміці першої частини субпопуляції 3–8,9С; динаміка другої частини субпопуляції 3–8,9С робила позитивний вне-

сок у потік трахеїд. При переході до другої складової знаки внесків у потік трахеїд у варіанта К-27 (Рж) не змінювалися.

Характеристика структури субпопуляцій за показником площі ядерця. Кожен варіант культивування характеризується широким розмахом значень цього показника та специфічним набором субпопуляцій, втім, у всіх варіантів зберігається поділ загальної клітинної популяції на субпопуляції з меншими і більшими значеннями площі ядерця (табл. 2). Знаки їхніх внесків у біологічні потоки показників продуктивності наведено в табл. 3.

У штамі К-27 за стандартних умов вирощування (К-27 (10С)) домінує субпопуляція з площею ядерця менше $10,9 \text{ мкм}^2$ (частка 0,56), у варіанта К-27 (5С) – менше 4 мкм^2 (частка 0,48), а у К-27 (Рж) – понад 8 мкм^2 (частка 0,39). Зміна превалуючих субпопуляцій, можливо, характеризує особливості диференціації у зв'язку з пристосуванням до конкретних умов культивування.

У варіанта К-27 (10С) динаміка субпопуляції з площею ядерця $12\text{--}16,9 \text{ мкм}^2$ та (частково) понад 17 мкм^2 робить позитивний внесок у динаміку першої складової потоку біомаси. Внесок динаміки субпопуляції з площею ядерця $12\text{--}16,9 \text{ мкм}^2$ у відповідну складову потоку алкалоїдів також є позитивним, а динаміки субпопуляції понад 17 мкм^2 – негативним. У варіанта К-27 (5С) динаміка клітинної популяції (обох субпопуляцій) робить позитивний внесок у потік накопичення біомаси, тоді як у потік накопичення алкалоїдів внесок динаміки частини субпопуляції з площею ядерця менше 4 мкм^2 є негативним.

Для К-27 (Рж) динаміка однієї частини субпопуляції з ядерцями площею понад 8 мкм^2 на першій складовій обох потоків дає позитивний внесок, а іншої – негативний. Гетерогенність внесків за знаками спостерігається і на другій складовій відповідних потоків. Зокрема, у К-27 (10С) частина субпопуляції з площею ядерця менше $10,9 \text{ мкм}^2$ робить позитивний внесок у динаміку другої складової потоку біомаси, динаміка її іншої частини та субпопуляції клітин з ядерцями $12\text{--}16,9 \text{ мкм}^2$ за негативного внеску в потік біомаси дає позитивний внесок у динаміку другої складової потоку алкалоїдів. У варіанті К-27 (Рж) також відмічено

«спеціалізацію» субпопуляцій в межах певного потоку. Динаміка субпопуляції з площею ядерця $2\text{--}4,9 \text{ мкм}^2$ робить позитивний внесок у динаміку другої складової потоку біомаси за одночасного негативного внеску в потік алкалоїдів; динаміка субпопуляції з площею ядерця понад 8 мкм^2 дає негативний внесок у потік накопичення біомаси; динаміка однієї частини цієї ж субпопуляції та субпопуляції з площею ядерця $2\text{--}4,9 \text{ мкм}^2$ робить негативний внесок у потік алкалоїдів. Можливо, саме та частина субпопуляції з площею ядерця понад 8 мкм^2 , що дає негативний внесок у потоки накопичення біомаси та індолінових алкалоїдів, пов'язана з позитивним внеском у потік трахеїд (табл. 3). У варіанта К-27 (5С) позитивний внесок у біологічний потік трахеїд дає динаміка лише частини субпопуляції з площею ядерця менше 4 мкм^2 (табл. 3), а у К-27 (10С) на першій складовій позитивний внесок мала динаміка обох субпопуляцій, а на другій – динаміка частини субпопуляції з площею ядерця, меншою за $10,9 \text{ мкм}^2$ (табл. 3).

Виявилось, що, крім змін у розподілі внесків динаміки субпопуляцій клітин, що відбивають варіації структури субпопуляцій у кожному з досліджених потоків, спостерігаються зміни коефіцієнта адаптації певного потоку відносно динаміки кількісного складу субпопуляцій за зміни умов культивування.

Результати порівняння кривих відповідних потоків, вирахованих з лінійних рівнянь, з отриманими в експерименті, дозволили виявити особливості залежностей кожного потоку від динаміки кількісного складу субпопуляцій клітин за різних умов культивування, представлених у вигляді коефіцієнтів адаптації A_{mn} (табл. 3); остаточні результати, розраховані з системи феноменологічних рівнянь, наведено на рис. 3.

У разі потоку біомаси за відсутності змін у максимальних значеннях потоку, вирахованих з рівнянь та отриманих в експерименті (рис. 3, а, з, е), варто зауважити, що коефіцієнт адаптації властивості накопичення біомаси є сталим за зміни максимальних значень потоку для різних умов культивування (рис. 3, а, з, е; табл. 3). Коефіцієнт адаптації властивості накопичення індолінових алкалоїдів (A_{mn}) у варіанта К-27 (10С) в 2,5 разу вищий для пер-

шої складової, у К-27 (Рж) він є нижчим в 1,3 разу для першої та в 4 рази – для другої складової, а в К-27 (5С) цей коефіцієнт є нижчим в 1,7 разу за відсутності змін максимальних значень потоку для різних умов культивування (рис. 3, в, е, з; табл. 3). Якщо максимальне значення потоку алкалоїдів – це незмінна величина (рис. 3, в, е, з), то зменшення внеску відповідних сил у відповідь на зміну умов вирощування призводить до зростання коефіцієнта адаптації окремих сил до даного потоку і навпаки. Що стосується потоку накопичення трахеїд, то коефіцієнт адаптації властивості їхнього накопичення вдвічі збільшується для варіанта К-27 (10С) і втричі – для К-27 (Рж) (рис. 3, б, д, ж; табл. 3).

Висновки. За стандартних умов поверхневого культивування високопродуктивного штаму К-27 *R. serpentina* (на середовищі 10С) частки двох субпопуляцій клітин з різним відносним вмістом ДНК (до 3С та 3–6,9С) майже рівні. В умовах поверхневої культури на збідненому середовищі 5С домінує субпопуляція клітин з відносним вмістом ДНК 1–2,9С, а в умовах глибинної культури на спеціальному середовищі Рж домінують клітини, які містять 3–8,9С ДНК. Змінюється знак внеску динаміки клітин відповідних субпопуляцій в біологічні потоки: динаміка субпопуляцій, які забезпечують потік біомаси, за нових умов вирощування дає внесок у потік індолінових алкалоїдів і навпаки. За показником «площа ядрця» в усіх трьох варіантах культивування встановлено розподіл клітинної популяції на дві субпопуляції (з меншими і більшими значеннями площі ядрця); внесок їхньої динаміки у біологічні потоки залежить від конкретних умов культивування.

Зміна умов культивування також спричиняє зміни коефіцієнта адаптації потоків диференціації клітин (трахеїд та інших клітин, що синтезують індолінові алкалоїди): 1) при зміні живильного середовища 10С на середовище 5С коефіцієнт адаптації потоку трахеїд зменшується в два рази, а коефіцієнт адаптації першої складової потоку алкалоїдів збільшується у 4,3 разу; 2) при переході від поверхневого вирощування на середовищі 10С до глибинного в рідкому середовищі Рж коефіцієнт потоку трахеїд зростає в 1,5 разу, а коефіцієнт адап-

тації потоку алкалоїдів збільшується в 3,3 разу для першої складової та в 4 рази – для другої.

I. Yu. Parnikozha, N. Yu. Miriuta, Yu. Al-Ammouri, V. A. Kunakh

Rauwolfia serpentina Benth. cell populations dynamics in the context of different cultivation conditions *in vitro*

Summary

The article describes a dynamics of the cell populations of R. serpentina strain K-27, which is a superproducent of anti-arrhythmic alkaloid aimaline, depending on the sucrose and inorganic substances contents and the tissue position in the culture (superficial or submerge). The authors have analysed the dynamics of cell quantity judging from the relative DNA content and nucleolus area. The specific rate of productivity, namely the biomass and indoline alkaloids accumulation, have been established in dependence on dynamics of definite cell subpopulations. The influence of all cultivation versions on cell populations variation in both cell parameters have been studied. Thermodynamic approach have been used to describe specific accumulation changes rate of biomass, tracheids and alkaloids that depend on the cell subpopulations dynamics were analyzed by paired linear regression.

Keywords: plant tissue culture, Rauwolfia serpentina, cell population dynamics in vitro.

И. Ю. Парникоза, Н. Ю. Мирюта, Ю. Ал-Аммури, В. А. Кунах

Динамика клеточных популяций Rauwolfia serpentina Benth. в различных условиях культивирования in vitro

Резюме

Исследована динамика клеточных популяций высокопродуктивного штамма К-27 Rauwolfia serpentina – продуцента противоритмического алкалоида аймалина в разных условиях выращивания на средах с различным содержанием сахарозы и минеральных солей. Изучена динамика количества клеток по отношению к содержанию ДНК и площади ядрышка, а также зависимость удельных скоростей показателей продуктивности (накопление биомассы и алкалоидов) от вклада динамик отдельных субпопуляций клеток. Проанализирована изменчивость структуры клеточных популяций по обоим показателям в разных условиях выращивания. Для их описания применен термодинамический подход, состоящий в изучении методом парной линейной регрессии особенности изменения потоков накопления биомассы, трахеид и алкалоидов в зависимости от вклада биологических сил – динамик субпопуляций клеток по отношению к содержанию ДНК и площади ядрышка.

Ключевые слова: культура тканей растений, Rauwolfia serpentina, динамика клеточных популяций in vitro.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.–Київ: Логос, 2005.–730 с.
2. Lee M. The chromosomal basis of somaclonal variation // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–1988.–39.–Р. 413–437.

3. Андреев І. О., Спіріданова К. В., Кунах В. А. Перебудови рослинного геному в культурі клітин *in vitro* // Біополімери і клітина.–2004.–**20**, № 1–2.–С. 42–49.
4. Мирюта Н. Ю., Аль-Аммури Ю., Ревякина О. Ю., Можилевская Л. П., Кунах В. А. Изменчивость параметров продуктивности при поверхностном и глубинном выращивании каллусных тканей раувольфии змеиной – продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология.–2006.–№ 4.–С. 64–73.
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 // Біополімери і клітина.–2006.–**22**, № 2.–С. 149–156.
6. 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.
7. А. с. СССР № 1167895 от 08.03.1985. Питательная среда для выращивания культуры тканей раувольфии змеиной – продуцента алкалоидов / А. Г. Воллосович, Т. Ю. Мартынова, С. Я. Полищук (непубл.).
8. 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.
9. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани раувольфии змеиной // Растит. ресурсы.–1979.–**15**, № 4.–С. 516–526.
10. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Можилевська Л. П., Мирюта Н. Ю. Спосіб вирощування калусної культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. – продуцента аймаліну: Деклараційний патент України № 12083/п1 від 27.03.2006 // Бюл. № 5.
11. Тимошевский Б. П., Назаренко С. А. Интерфазная цитогенетика в оценке геномных мутаций в соматических клетках // Генетика.–2005.–№ 1.–С. 268–273.
12. Архипчук В. В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика.–1995.–**29**, № 13.–С. 6–11.
13. Мирюта Н. Ю., Парникоза И. Ю., Аль-Аммури Ю., Кунах В. А. Применение термодинамического подхода для изучения динамики клеточных популяций *in vitro* на примере культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. – продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология.–2006.– № 2.–С. 78–95.
14. Kiernon J. A. Histological and histochemical methods. Theory and practice.–New-York: Pergamon press, 1990.–Р. 136–364.
15. Зотин А. И., Зотина Р. С. Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения // Журн. общ. биологии.–1969.–**30**, № 1.–С. 94–109.
16. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики.–Москва: Финансы и статистика, 1982.–344 с.
17. Зотина Р. С., Зотин А. И. Объединенные уравнения роста // Журн. общ. биологии.–1973.–**34**, № 4.–С. 606–616.

УДК 576.53:581.143.6
Надійшла до редакції 14.12.07