

Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании

В. А. Кунах, Ю. Аль-Аммури, Н. Ю. Мирюта, Л. П. Можилевская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
kulakh@imbg.org.ua

Изучено накопления индолиновых алкалоидов, в том числе аймалина, в биомассе культуры тканей раувольфии змеиной на примере гормонезависимого высокопродуктивного штамма К-27 при его поверхностном и глубинном выращивании на разных по содержанию минеральных компонентов и сахарозы питательных средах. Установлены оптимальные составы сред для обоих способов выращивания. Подобраны условия двухэтапного выращивания в поверхностной, а затем в глубинной культуре на простых по составу питательных средах, что повышает уровень накопления алкалоидов в ранние сроки в 3–4 раза и позволяет сократить время от начала роста каллусных тканей до съема урожая с 60–80 до 20–40 сут.

Ключевые слова: аймалин, индолиновые алкалоиды, культура тканей растений, Rauwolfia serpentina, клеточные линии – продуценты алкалоидов.

В большинстве известных случаев клеточные культуры разных видов алкалоидоносных растений при длительном выращивании *in vitro* не способны накапливать алкалоиды вообще либо накапливают их в незначительном количестве [1]. На этом фоне выгодно отличаются клеточные линии раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth), выделенные из каллуса, полученного Р. Г. Бутенко из фрагмента молодого зеленого стебля 5-летнего растения в 1964 г. в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР. Эти линии способны в течение уже более 40 лет накапливать от 0,2 до 2 % индолиновых алкалоидов в сухой биомассе, среди которых 70–90 % составляет прогивоаритмический алкалоид аймалин (схема 1). В специальных условиях выращивания содержание индолиновых алкалоидов в сухой биомассе может достигать 20 %, а общая продуктивность в благоприятной среде в отдельных случаях превышает 700 мг аймалина из 1 л [1, 7, 9].

© В. А. КУНАХ, Ю. АЛЬ-АММУРИ, Н. Ю. МИРЮТА,
Л. П. МОЖИЛЕВСКАЯ, 2006

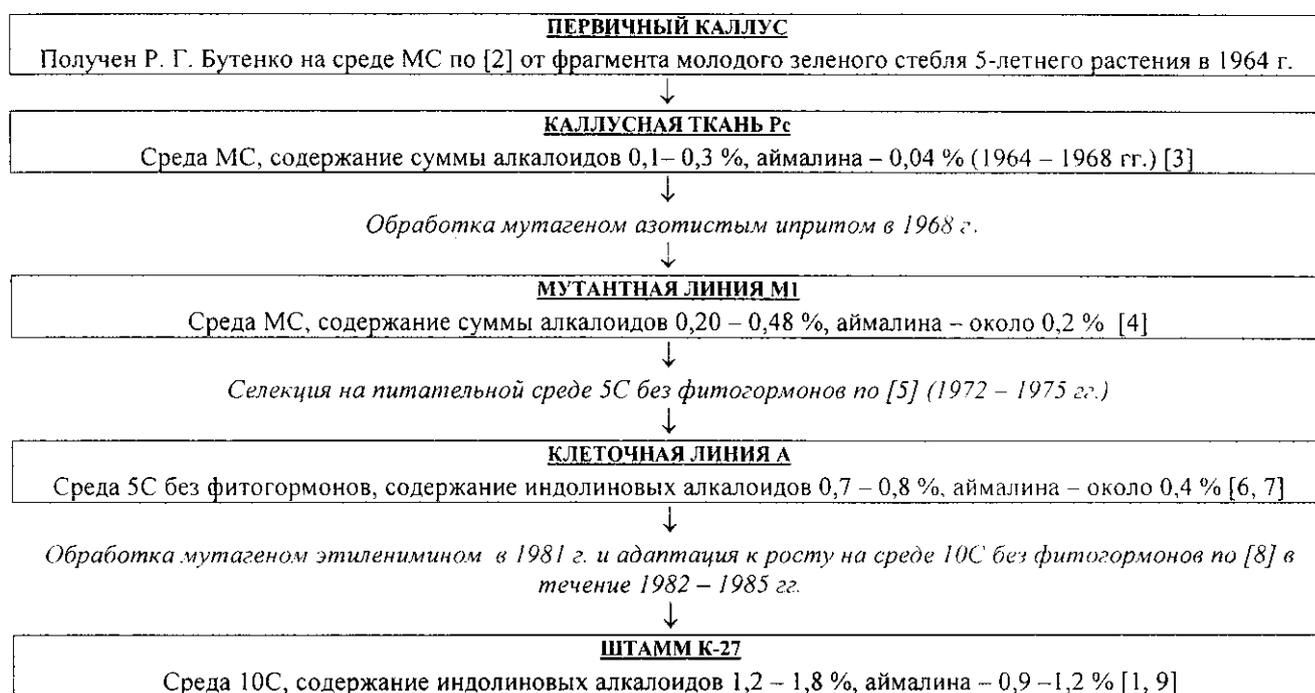
Наиболее продуктивным из известных клеточных культур *R. serpentina* является каллусный штамм К-27. Этот штамм при выращивании на специально разработанной агаризованной питательной среде 10С без фитогормонов, содержащей 10 % сахарозы по [8], накапливает 1,2–1,8 % индолиновых алкалоидов и 0,9–1,2 % аймалина (схема 1).

Выращивание этого штамма в промышленных условиях на Харьковском химико-фармацевтическом заводе «Здоровье трудящимся» в течение более 10 лет показало стабильность его продуктивности. Однако поверхностное выращивание каллусных тканей на агаризованной среде в больших масштабах продемонстрировало низкую технологичность процесса получения сырья (клеточной биомассы), используемого как источник аймалина.

По предварительным данным, более технологичным является выращивание культуры тканей раувольфии в жидкой питательной среде.

Схема 1

Генеалогия и уровень накопления индолиновых алкалоидов в сухой биомассе клеточных линий раувольфии *Rauwolfia serpentina* Benth., выращиваемых на разных питательных средах, содержащих агар (поверхностное выращивание)



Ранее получены высокопродуктивные штаммы суспензионных культур раувольфии змеиной [1, 10]. Однако они оказались малопригодными при использовании в масштабном производстве из-за повышенной чувствительности к режиму выращивания и потребности в специальном оборудовании.

Альтернативным может быть рост каллусных тканей высокопродуктивных штаммов в жидкой среде в виде глубинной культуры при постоянном перемешивании. Однако особенности выращивания и продуктивности каллусных тканей раувольфии змеиной изучали лишь на примере сравнительно низкой по продуктивности клеточной линии А [11]. Каллусные ткани более продуктивных штаммов, в том числе штамма К-27, в жидкой среде растут плохо или совсем не растут и через короткий промежуток времени гибнут [1].

В настоящей работе приведены результаты изучения накопления индолиновых алкалоидов и общей продуктивности высокопродуктивного штамма К-27 при выращивании его в различных условиях (поверхностном и глубинном) на разных типах питательных сред, специально разработанных для культуры тканей раувольфии змеиной.

Материалы и методы. Объектом исследования

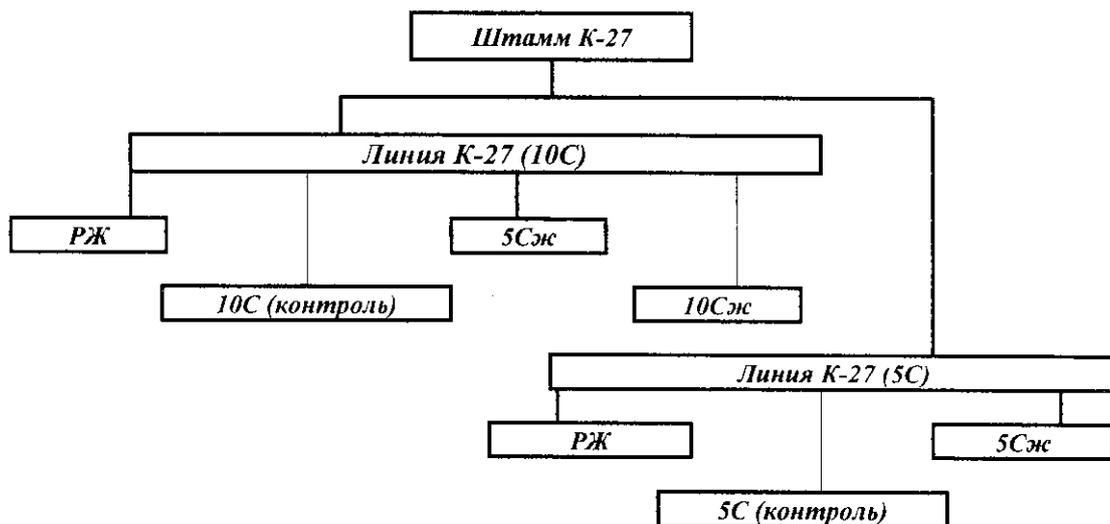
служил гормонезависимый каллусный штамм К-27 *R. serpentina*, продуктивность, генетические и биохимические особенности которого описаны в работах [1, 12]. С 1982 г. штамм выращивается на агаризованной среде 10С по [8] (клеточная линия К-27 (10С)), а с 2000 г. параллельно его выращивают на агаризованной среде 5С по [5] (клеточная линия К-27 (5С)).

В экспериментах использовали эти же среды без агара (жидкие среды) — 10Сж и 5Сж, а также специально разработанную жидкую питательную среду РЖ по [13] для глубинного выращивания культуры тканей *R. serpentina* (схема 2). Культуральные среды существенно отличаются между собой по минеральному составу (количество и соотношению макро- и микроэлементов), а также по содержанию сахарозы (10, 5 и 3 % соответственно). Во всех средах отсутствовали регуляторы роста, из витаминов в них входил только тиамин.

Ткани выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды. Размер экспланта при пересадках составлял 4–5 г живой ткани на колбу. Жидкие культуры растили на шейкерах с циклом колебаний 60–70 об/мин. Выращивание осуществляли при температуре 25–27 °С без освещения.

Схема 2

Изучение условий выращивания на уровень биосинтеза индолиновых алкалоидов в гормонезависимых клеточных линиях штамма *K-27 Rauwolfia serpentina*



Каллусные ткани исследовали в течение 90—130 сут роста без пересадки при обычной длительности пассажа до пересадки для изучаемого штамма 35—40 сут и до съема урожая 60—80 сут. В течение каждого пассажа через каждые 10 сут брали для анализа 3—5 колб каждого варианта со средним темпом роста. Определяли количество свежей и сухой биомассы и содержание в сухой биомассе индолиновых алкалоидов фотометрически по [14]. В отдельных случаях индивидуальные алкалоиды выявляли микрохроматографически по [15]. Аналитическая повторяемость определений составляла 3—5 раз.

Результаты и обсуждение. В обычных условиях выращивания клеточная линия K-27 (10C) на агаризованной среде 10C на 50—60-е сут роста накапливала сухой биомассы около 55 г в 1 л питательной среды (табл. 1; рис. 1, а), а линия K-27 (5C) на агаризованной среде 5C — около 40 г/л (табл. 1; рис. 2, а). В дальнейшем выход сухой массы в течение пассажа уменьшался.

Кривая накопления индолиновых алкалоидов имела более сложный характер. В течение пассажа отмечали, как правило, два подъема содержания алкалоидов в сухой биомассе. Например, для линии K-27 (10C) один пик содержания алкалоидов наблюдался во время максимального выхода сухой биомассы (около 1 % на 60-е сут роста), а второй — после 90-х сут роста на фоне снижения количества сухой биомассы (рис. 1, а). Соответст-

венно кривая выхода алкалоидов была двухвершинной. В обоих пиках (на 60-е и 110-е сут) выход составлял 670—700 мг/л среды (табл. 1; рис. 1, б). У линии K-27 (5C) максимальный выход алкалоидов отмечали на 60—70-е сут роста, когда их содержание в сухой биомассе составляло около 1 %, а выход — 380—400 мг/л среды (рис. 2, а, б; табл. 1).

При выращивании в жидких средах исходным материалом служила каллусная ткань обеих клеточных линий 40-дневного возраста (схема 2). Во всех вариантах жидких сред обе линии штамма K-27 росли в виде сравнительно крупных глобул диаметром 0,5—2 см. Глубинная культура характеризовалась сравнительно коротким периодом роста, ее рост заканчивался к 20-м сут в среде РЖ и к 40-м сут в иных вариантах жидких сред (5СЖ и 10СЖ) (рис. 1, 2).

Продуктивность изученных линий при их выращивании в глубинной культуре на разных по составу питательных средах была различной. Так, линия K-27 (10C) в среде 10СЖ накапливала менее 20 мг/л сухой биомассы, а алкалоидов практически не синтезировала (табл. 1, рис. 1, ж, з). В среде РЖ прирост сухой биомассы был еще ниже — всего около 10 г/л, однако биосинтез алкалоидов был интенсивным, их содержание достигало 1,3 % на 50-е сут роста (рис. 1, в). Лучшей из жидких сред для линии K-27 (10C) представляется среда 5СЖ, где выход сухой биомассы составлял более 20 г/л,

Таблица 1

Динамика накопления биомассы и индолиновых алкалоидов в течение пассажа клетками штамма K-27 *Rauwolfia serpentina* в разных условиях выращивания

Клеточная линия	Среда	Время, сут	Сухая масса, г/л	Выход алкалоидов, мг/л
K-27 (10С)	10С	20	18,6	62
		30	34,4	205
		40	44,6	243
		50	55,5	558
		60	55,6	676
	10Сж	20	7,6	42
		50	17,7	8
	5Сж	40	20,4	333
		РЖ	30	10,1
K-27 (5С)	5С	30	23,7	117
		40	40,2	219
		70	36,3	387
	5Сж	50	20,5	188
		РЖ	40	13,9

Примечание. Представлены выборочные результаты, полные данные приведены на рис. 1, 2.

содержание алкалоидов в ней превышало 1,5 % на 40-е сут роста, а выход их в это время достигал более 330 мг/л среды (табл. 1; рис. 1, д, е).

Линия K-27 (5С) в жидких средах также росла хуже, чем в обычных условиях на агаризованной среде 5С (рис. 2), однако при этом в среде РЖ алкалоидов накапливалось почти в два раза больше, чем в контроле — их содержание в сухой биомассе превышало 2 %, а выход — 260 мг/л среды на 40-е сут роста (табл. 1; рис. 2, в, г).

Скорость накопления индолиновых алкалоидов в зависимости от условий выращивания колебалась для линии K-27 (10С) от 11 мг/л за 1 сут при выращивании в стандартных условиях на агаризованной среде 10С (контроль) до менее чем 2 мг/л за 1 сут в жидкой среде 10Сж (рис. 3, а). В клеточной линии K-27 (5С) алкалоиды накапливались в два раза медленнее как в контроле (агаризованная среда 5С), так и в жидкой среде 5Сж. В жидкой среде РЖ скорость накопления алкалоидов у обеих линий была практически одинаковой — около 6 мг/л за 1 сут (рис. 3). Математическая обработка полученных данных, в том числе частично приведенных на рис. 1—3 и в табл. 1, показала, что оптимальной для выращивания штамма K-27 в глубинной культуре является среда РЖ, поскольку параметры продуктивности в ней были более ста-

бильными и характеризовались меньшим размахом изменчивости, чем при выращивании в жидких средах того же состава (неопубликованные данные). При этом более продуктивной в среде РЖ была линия K-27 (5С), накапливающая около 2 % аймалина (рис. 2, в). Однако штамм K-27 при длительном выращивании на несвойственной для него среде 5С характеризуется нестабильной продуктивностью и более низким выходом алкалоидов, чем на среде 10С. Поэтому в дальнейших экспериментах продуктивность изучали в глубинной культуре при двухэтапном выращивании штамма K-27.

Суть этих опытов заключается в том, что ткань штамма K-27, с 1982 г. культивируемого на среде 10С поверхностным способом, в течение одного пассажа выращивали на более простой по составу среде 5С также поверхностным способом (30—45 сут), а затем полученную ткань переносили в среду РЖ и продолжали выращивать при постоянном перемешивании. Результаты изучения продуктивности при таком способе выращивания показали, что содержание аймалина в сухой биомассе на втором этапе (в жидкой среде специального состава) возрастает в 2—3 раза по сравнению с контролем (штамм K-27 на среде 10С). За счет этого срок выращивания каллусной ткани, накапливающей 1 % и более аймалина, существенно

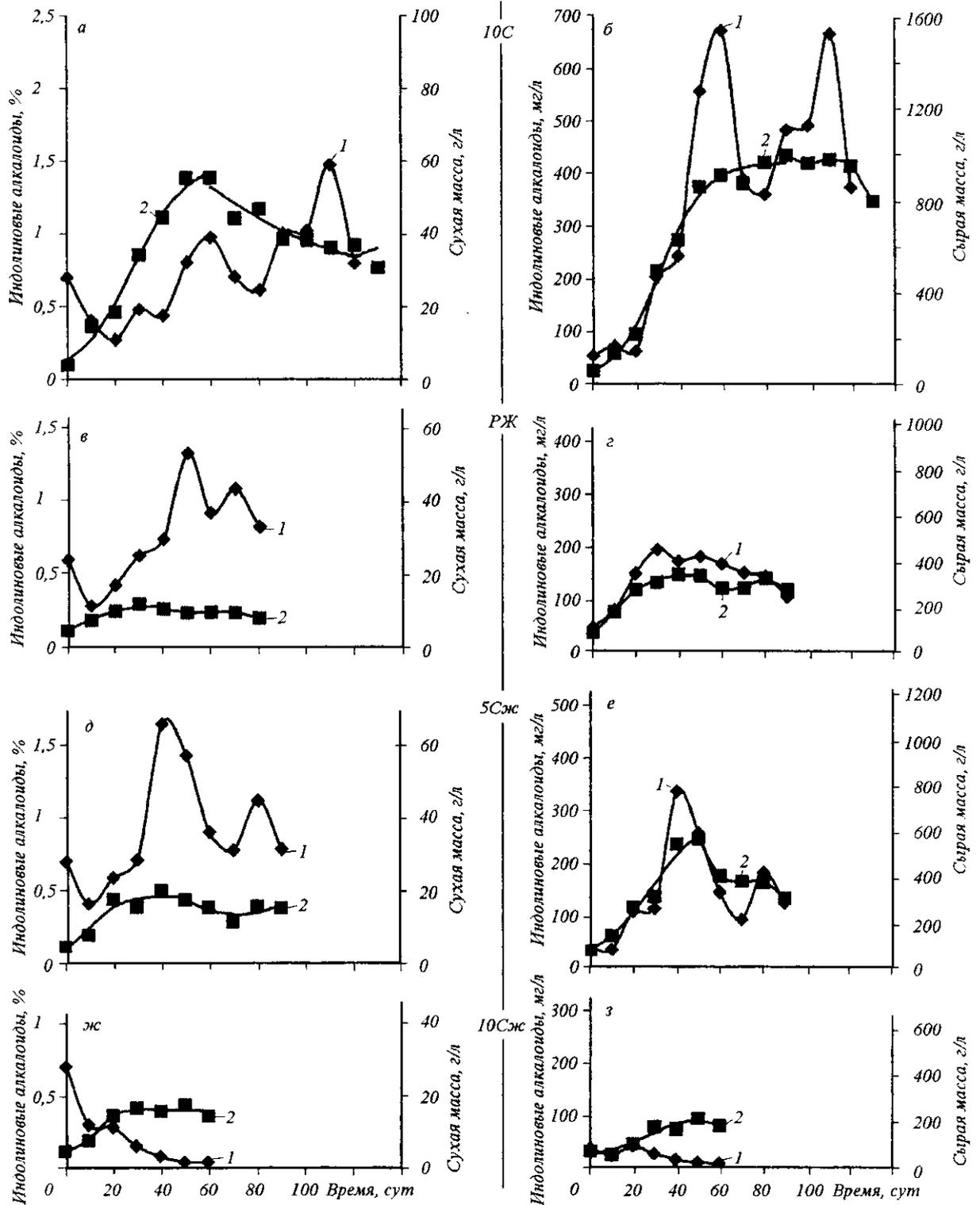


Рис. 1. Динамика накопления индолиновых алкалоидов и биомассы в течение пассажа каллусной тканию линии К-27 (10С) *R. serpentina* при выращивании в разных средах (а, в, д, ж: 1 — содержание алкалоидов в сухой биомассе, %; 2 — выход сухой массы, г/л; б, г, е, з: 1 — выход алкалоидов, мг/л; 2 — накопление сырой массы, г/л). 10С — контроль, агаризованная среда по [8]; PЖ — жидкая среда по [13]; 5Сж — жидкая среда 5С по [5]; 10Сж — жидкая среда 10С

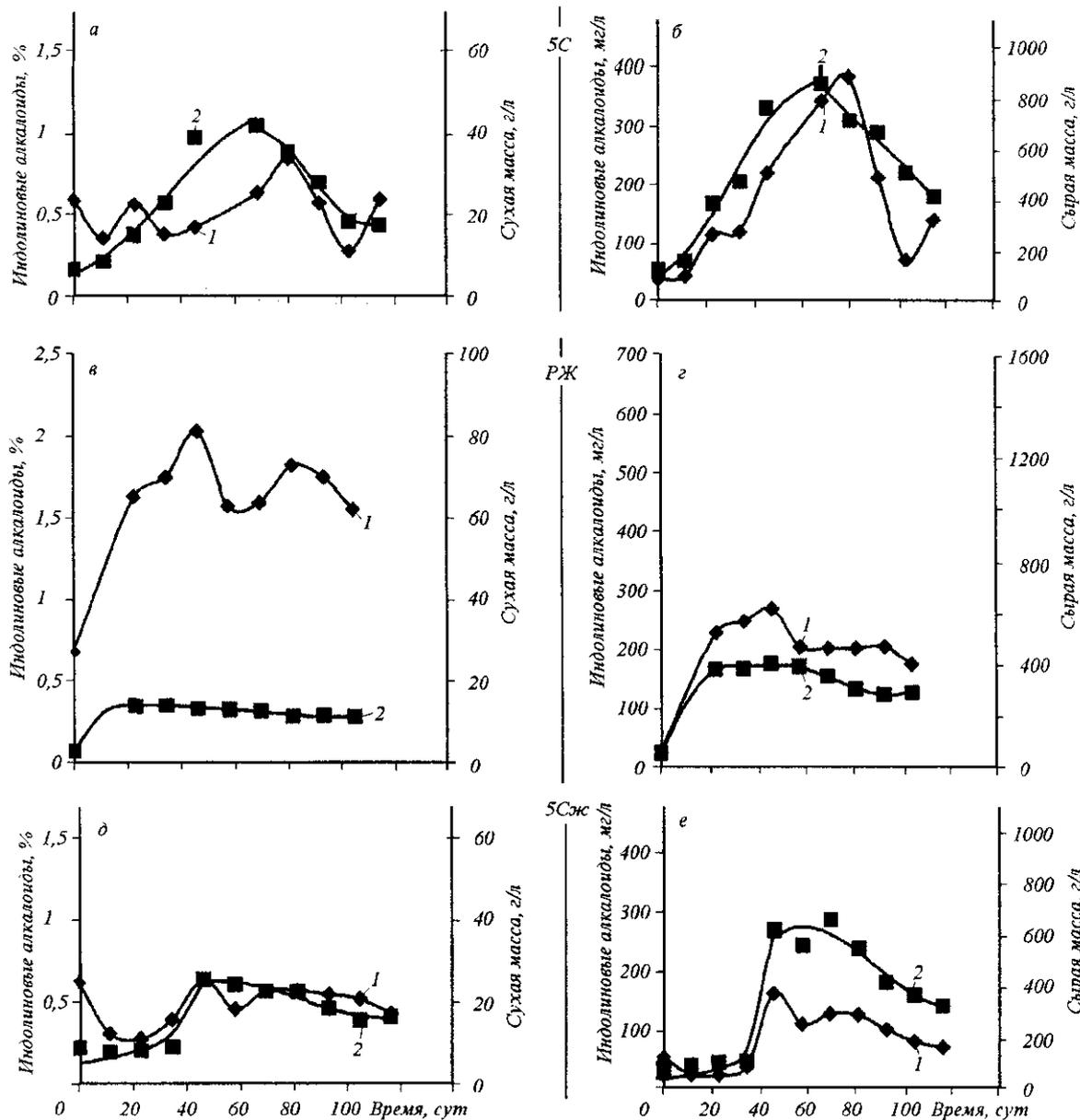


Рис. 2. Динамика накопления индолиновых алкалоидов и биомассы в течение пассажа каллусной тканью линии К-27 (5С) *R. serpentina* при выращивании в разных средах (а, в, д: 1 — содержание алкалоидов в сухой массе, %; 2 — выход сухой массы, г/л; б, г, е: 1 — выход алкалоидов, мг/л; 2 — накопление сырой массы, г/л). 5С — контроль, агаризованная среда по [5]; РЖ — жидкая среда по [13]; 5Сж — жидкая среда 5С

сокращается — до 20—30 сут, т. е. практически в 3 раза (табл. 2).

Еще более интересные данные получены при удлинении первого этапа двухэтапного выращивания (культивирование посевной ткани штамма К-27 на среде 5С) до 5—10 пассажей (время одного пассажа 35—45 сут). И лишь после этого ткань переносили в среду РЖ. В данном случае скорость

накопления аймалина увеличивалась еще более значительно и по сравнению с выращиванием на среде 10С (контроль) содержание этого алкалоида на 20—35-е сут роста возрастало в 3—4 раза, достигая 1,8 % (табл. 2).

Таким образом, полученные данные подтвердили, что оптимальной культуральной средой для выращивания и поддержания в длительной коллек-

Таблица 2

Динамика накопления аймалина в сухой биомассе культуры тканей штамма K-27 *Rauwolfia serpentina* при его двухэтапном выращивании в глубинной культуре (суммарные данные трех опытов по пять повторностей в каждом)

Время роста, сут	Контроль (агаризованная среда 10С по [8])	Выращивание в жидкой среде РЖ по [13]			
		После одного пассажа на агаризованной среде 5С по [5]		После шести пассажей на агаризованной среде 5С по [5]	
		Содержание аймалина, %	Эффект стимуляции, %	Содержание аймалина, %	Эффект стимуляции, %
5	0,40	0,40	102,5	0,58	145,0
10	0,39	0,49	125,6	0,62	159,0
15	0,35	0,69	197,1	0,84	240,0
20	0,32	1,00	312,5	1,12	350,0
25	0,40	1,08	270,0	1,59	397,5
30	0,48	1,08	225,0	1,75	364,6
35	0,61	1,12	183,6	1,81	296,7
40	0,73	1,01	138,4	1,83	250,7
45	0,85	1,07	125,9	1,78	209,4
50	0,92	1,12	121,7	1,75	190,2
60	0,98	1,15	117,4	1,79	182,7

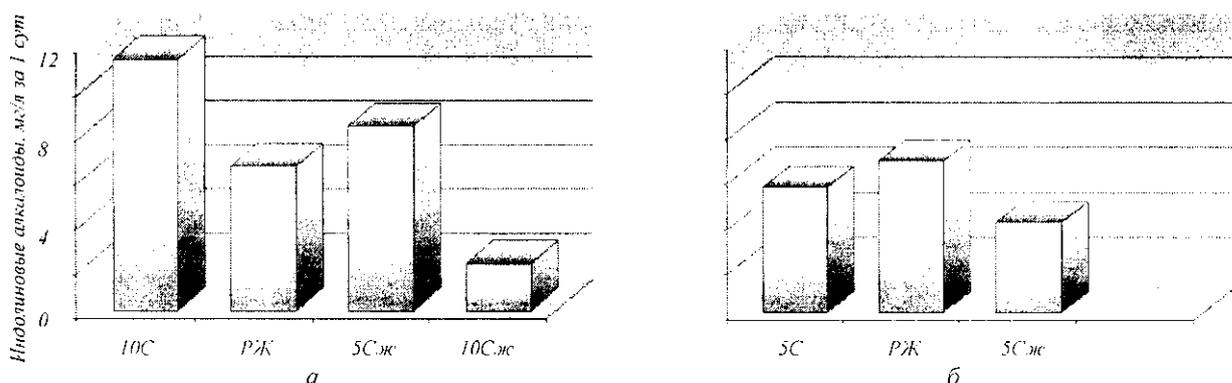


Рис. 3. Скорость накопления индолиновых алкалоидов (мг/л за 1 сут) клеточной линией K-27(10С) (а) и клеточной линией K-27(5С) (б) *Rauwolfia serpentina* в разных условиях выращивания (скорость накопления алкалоидов приведена для точек роста, в которых продуктивность была максимальной): 10С — контроль, агаризованная среда по [8], длительность пассажа 60 сут; 5С — контроль, агаризованная среда по [5], длительность пассажа 70 сут; РЖ — жидкая среда по [13], длительность пассажа 30 (а) и 40 сут (б); 5Сж — жидкая среда 5С, длительность пассажа 40 (а) и 50 сут (б); 10Сж — жидкая среда 10С, длительность пассажа 20 сут

ции высокопродуктивного штамма K-27 раувольфии змеиной является агаризованная среда 10С по [8]. Для ускоренного и более технологичного получения больших объемов клеточной биомассы, содержащей 1—1,8 % аймалина на 20—35-е сут роста, следует применять двухэтапное выращивание каллусных тканей. Первым этапом является выращивание коллекционного материала штамма K-27 (линия K-27 (10С)) на агаризованной среде 5С по [5], а вторым — выращивание каллусной ткани в жидкой культуральной среде РЖ по [13] с некоторыми модификациями на шейкерах (качал-

ках) или в биореакторах (ферментерах). Предварительное выращивание на среде 5С может длиться один пассаж (30—45 сут), однако увеличение количества таких пассажей до 5—10 повышает накопление алкалоидов в 3—4 раза (табл. 2).

Выводы. 1. Оптимальной культуральной средой для длительного выращивания в коллекции высокопродуктивного гормоннезависимого штамма K-27 раувольфии змеиной поверхностным способом является среда 10С по [8].

2. Для глубинного выращивания штамма K-27 лучшей признана жидкая среда РЖ по [13].

3. Эффективным способом выращивания для ускоренного накопления индолиновых алкалоидов является двухэтапное выращивание штамма К-27. На первом этапе каллусные ткани выращивают на агаризованной среде 5С по [5], на втором — в жидкой культуральной среде РЖ с некоторыми модификациями.

4. Разработанный способ двухэтапного выращивания каллусных тканей раувольфии змеиной повышает уровень накопления аймалина в ранние сроки в 3—4 раза и позволяет сократить время от начала роста до съема урожая с 60—80-х сут до 20—40-х сут, когда в сухой биомассе накапливается до 1,8 % аймалина.

V. A. Kunakh, J. Al-Ammouri, N. Ju. Miryuta, L. P. Mozhylevska

The indoline alkaloids accumulation by *Rauwolfia serpentina* cell lines upon surface and submerged maintenance

Summary

Indoline alkaloids accumulation, including ajmaline, in the biomass of *R. serpentina* cell line culture on the example of hormone independent highly productive strain K-27 at its surface and submerged maintenance in nutrient media with differing mineral composition has been studied. Optimal nutrient media for both ways of maintenance have been identified. The conditions for two-step maintenance in surface, followed by submerged cultures, in compositionally simple nutrient media have been specified. Two-step maintenance increases alkaloids accumulation at the early stages of growth 3—4 times and allows decreasing the time of callus tissue growing from 60—80 days to 20—40 days.

Key words: ajmaline, indoline alkaloids, plant tissue culture, *R. serpentina*, cell lines — alkaloids producers.

В. А. Кунах, Ю. Аль-Аммурі, Н. Ю. Мірюта
Л. П. Можилевська

Накопичення індолінових алкалоїдів клітинними лініями раувольфії зміїної за поверхневого і глибинного вирощування

Резюме

Вивчено накопичення індолінових алкалоїдів, у тому числі аймаліну, в біомасі культури тканин раувольфії зміїної на прикладі гормонезалежного високопродуктивного штаму К-27 за його поверхневого і глибинного вирощування на різних за мінеральним складом та вмістом сахарози живильних середовищах. Визначено оптимальні середовища для обох способів вирощування. Підбрано умови двоетапного вирощування у поверхневій, а потім у глибинній культурі на простих за складом живильних середовищах, що підвищує рівень накопичення алкалоїдів у ранні строки росту в 3—4 рази і скорочує час від початку росту калусних тканин до збирання врожаю з 60—80 до 20—40 днів.

Ключові слова: аймалін, індолінові алкалоїди, культура тканин рослин, *Rauwolfia serpentina*, клітинні лінії — продуценти алкалоїдів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кунах В. А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.—Київ: Логос, 2005.—730 с.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. plant.*—1962.—15.—P. 473—497.
3. Воллосович А. Г., Бутенко Р. Г. Культура ткани раувольфии змеиной как продуцент алкалоидов // *Культура изолированных органов, тканей и клеток растений.*—М.: Наука, 1970.—С. 253—257.
4. Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Действие азотистого иприта на культуру изолированных тканей раувольфии // *Генетика.*—1972.—8, № 2.—С. 46—54.
5. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* // *Растит. ресурсы.*—1979.—15, № 4.—С. 516—528.
6. Воллосович Н. Е., Воллосович А. Г., Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* и их продуктивность // *Растит. ресурсы.*—1976.—12, № 4.—С. 578—583.
7. Kunakh V. A., Alkhimova E. G. *R. serpentina*: in vitro culture and the production of the ajmaline // *Biotechnol. in Agricult. and Forestry* / Ed. J. P. S. Bajaj.—Berlin etc.: Springer, 1989.—Vol. 7.—P. 398—416.
8. А. с. СССР № 1167895. Питательная среда для выращивания культуры тканей раувольфии змеиной — продуцента алкалоидов / А. Г. Воллосович, Т. Ю. Мартынова, С. Я. Полищук // Заявл. 08. 03. 1985. (Непубл.).
9. Vollosovich A. G. Some peculiarities of alkaloid accumulation in tissue culture *R. serpentina* // *Highlights Mod. Biochem. Proc. 14th Int. Congr. Biochem.* (Prague, 10—15 July, 1988.)—Токуо: Utrecht, 1989.—Vol. 2.—P. 1177—1182.
10. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *R. serpentina* Benth. in vitro // *Биотехнология.*—2001.—№ 4.—С. 9—21.
11. 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.
12. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia serpentina* // *Biotechnol. in Agricult. and Forestry* / Ed. J. P. S. Bajaj.—Berlin etc.: Springer, 1996.—Vol. 36.—P. 315—332.
13. Каухова И. Е., Воллосович А. Г., Цыганков В. А. Выбор питательной среды для глубинного выращивания тканей раувольфии змеиной (*R. serpentina* Benth.) // *Растит. ресурсы.*—1981.—17, № 2.—С. 217—224.
14. Воллосович А. Г., Николаева Л. А., Позднякова К. Н., Пучинина Т. Н. Метод количественного определения алкалоидов группы индолина в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth // *Растит. ресурсы.*—1977.—13, № 1.—С. 127—133.
15. Губарь С. И., Константинова Е. П., Кунах В. А. Количественное определение индолиновых алкалоидов в культивируемых клетках раувольфии с использованием микроколочной хроматографии // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 5.—С. 78—80.

УДК 615.222:581.143.6
Надійшла до редакції 12.12.05