

Стабильность генома высокопродуктивной клеточной линии K-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. при изменении условий выращивания

Е. В. Спиридонова, Д. М. Адноф, И. О. Андреев, В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

i.o.andreev@imbg.org.ua

Методом RAPD-ПЦР проведен генетический анализ тканей длительно пассируемого штамма K-27 R. serpentina, выращиваемых в условиях поверхностной и глубинной культуры на средах различного состава в течение четырех пассажей. Установлено, что изменение условий выращивания не приводит к существенным перестройкам генома штамма K-27 на молекулярном уровне. При этом смена условий выращивания с поверхностного на глубинное оказывает более сильное воздействие на геном культивируемых тканей по сравнению с изменением состава питательной среды. Введение дополнительного пассажа на твердой среде промежуточного состава, предшествующего переходу к глубинной культуре, позволяет снизить уровень происходящих изменений генома.

Ключевые слова: культура тканей растений, *Rauwolfia serpentina*, геном растений, RAPD-анализ.

Введение. Культура тканей и клеток растений представляет собой перспективный источник экологически безопасного сырья, которое можно использовать для получения биологически активных веществ растительного происхождения в ситуации ограниченности природных ресурсов. Технологии создания фармакологических препаратов и пищевых добавок на основе культуры тканей растений широко применяют во многих странах мира [1].

Получение и селекция высокопродуктивных штаммов и клеточных линий на начальных этапах происходят в лабораторных условиях, однако при переходе к условиям масштабного производства возникает вопрос о модификации лабораторного регламента выращивания. При этом дальнейшее использование клеточных линий-продуцентов в качестве источника определенных метаболитов возможно только при условии сохранения стабильно-

сти качественного состава и количественного содержания целевых продуктов. С учетом генетического контроля этих характеристик представляет интерес исследование генома сформированных штаммов пассируемой культуры при изменении условий выращивания.

Работу проводили на культуре тканей *R. serpentina* Benth. — тропического растения, продуцента индольных алкалоидов, широко применяемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Изучали стабильность генома сформированного клеточного штамма K-27 при изменении состава питательных сред и условий выращивания. Исследуемый штамм характеризуется повышенной продуктивностью индолиновых алкалоидов, в частности, противоритмического алкалоида аймалина и более 25 лет выращивается в стандартизованных условиях, обеспечивающих при поддерживающем отборе накопление 0,9—1,2 % аймалина в сухой биомассе [1, 2]. Данная работа является элементом

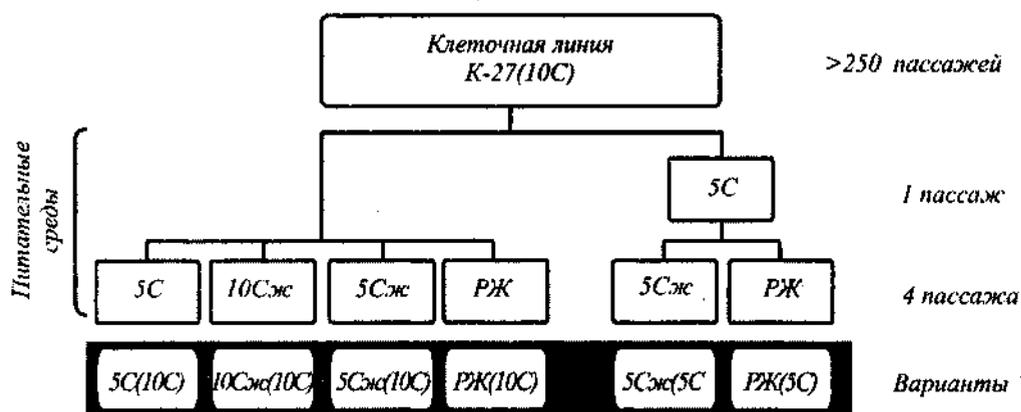


Рис. 1. Схема эксперимента по изучению влияния условий выращивания на геном гормонанезависимой клеточной линии K-27 (10C) штамма K-27 *R. serpentina* с обозначениями проанализированных вариантов культивируемых тканей

комплексного эксперимента, направленного на адаптацию штамма к условиям промышленного производства, в том числе оптимизацию условий выращивания культуры тканей раувольфии в жидкой питательной среде. Результаты изучения накопления индолиновых алкалоидов и общей продуктивности штамма K-27 при выращивании его в различных условиях (поверхностном и глубинном) на разных типах питательных сред опубликованы ранее [3, 4].

Материалы и методы. В работе использовали гормонанезависимый каллусный штамм K-27 *R. serpentina*, продуктивность, генетические и биохимические особенности которого описаны в работах [1, 5]. Штамм получен обработкой тканей клеточной линии А [2, 6] мутагеном этиленимином и дальнейшей селекцией по признаку «содержание алкалоидов» на специально разработанной питательной среде, обеспечивающей высокий уровень накопления индолиновых алкалоидов [2]. С 1982 г. штамм K-27 выращивается на агаризованной среде 10C по [7] (клеточная линия K-27 (10C)). Кроме того, в экспериментах использовали агаризованную среду 5C по [8] и те же среды без агара (жидкие среды) — 10Cж и 5Cж, а также специально разработанную питательную среду РЖ по [9] для глубинного выращивания культуры тканей *R. serpentina*. Каллусные культуры выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл агаризованной среды, в темноте при температуре 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 за 1 мин, в темноте при температуре 24–26 °С. Размер экспланта при пересадках составлял 4–5 г живой ткани на колбу. В ходе эксперимента (см. схему на рис. 1) ткань переносили на другую

среду и культивировали в течение четырех пассажей (длительность одного пассажа составляла 30 сут), после чего ткань использовали для выделения ДНК.

ДНК из культивируемых тканей выделяли с помощью цетавлона по методике [10]. Концентрацию и качество препаратов ДНК определяли визуально по интенсивности флуоресценции комплексов ДНК—бромистый этидий в УФ-свете после фракционирования в 1 %-м агарозном геле.

Геном анализировали при помощи RAPD-ПЦР. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технологии», РФ). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 × ПЦР-буфер с 2 мМ MgCl₂ («Медбиосервис», Украина), dNTP в концентрации 0,2 мМ каждый, 1 ед. Taq-полимеразы («Амплиценс», РФ), 0,25 мкМ праймер («Литех», РФ), 20 нг анализируемой ДНК. На нее наслаивали 20 мкл минерального масла. Для ПЦР использовали программу: денатурация при температуре 94 °С/2 мин; 5 циклов: денатурация при 94 °С/30 с, отжиг — 36 °С/30 с, элонгация — 72 °С/1 мин; 35 циклов: денатурация при 94 °С/20 с, отжиг — 36 °С/20 с, элонгация — 72 °С/40 с; элонгация — 72 °С/2,5 мин. В работе использованы 25 десятинуклеотидных праймеров (табл. 1), ПЦР с каждым праймером проводили в двух повторностях. Продукты амплификации разделяли в 1,7 %-м агарозном геле с бромистым этидием в 1 × TBE-буфере при напряжении электрического поля 4 В/см в течение 5 ч.

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 срав-

Таблица 1

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

№ варианта	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Количество ампликонов	Количество мажорных ампликонов
1	A01*	CAGGCCCTTC	15	8
2	A02	TGCCGAGCTG	5	5
3	A03*	AGTCAGCCAC	10	6
4	A04	AATCGGGCTG	7	4
5	A05	AGGGGTCTTG	14	6
6	A07	GAAACGGGTG	11	3
7	A08	GTGACGTAGG	8	5
8	A09	GGGTAACGCC	8	4
9	A11	CAATCGCCGT	3	3
10	A12*	TCGGCGATAG	12	3
11	A13*	CAGCACCCAC	16	6
12	A14	TCTGTGCTGG	7	1
13	A16*	AGCCAGCGAA	12	1
14	A17	GACCGCTTGT	8	4
15	A18	AGGTGACCGT	11	3
16	A19*	CAAACGTCCG	9	3
17	A20	GTGCGATCC	9	2
18	B01*	GTTTCGCTCC	10	5
19	B02	TGATCCCTGG	5	2
20	B04*	GGA CTGGAGT	11	4
21	B05	TGCGCCCTTC	14	4
22	B06	TGCTCTGCCC	11	4
23	B07	GGTGACGCAG	10	6
24	B08	GTCCACACGG	7	3
25	B10	CTGCTGGGAC	9	7
Всего			242	103

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

нению с исходным штаммом *K-27*, выращенным в стандартных условиях на среде 10С.

Результаты и обсуждение. Изучали реакцию на геномном уровне клеточной линии *K-27* (10С) *R. serpentina* при изменении состава питательной среды и условий выращивания, в частности, при переходе от поверхностного выращивания каллусной ткани к глубинному. При проведении эксперимента ткань с агаризованной среды 10С переносили на другую среду (5С, РЖ, 5Сж или 10Сж) и после культивирования на протяжении четырех пассажей проводили анализ ДНК методом RAPD-ПЦР. Варианты культивируемых тканей, полученные таким образом, обозначены нами как 5С (10С), РЖ (10С), 5Сж (10С) и 10Сж (10С). В другом случае ткани линии *K-27* (10С) в течение одного пассажа

выращивали на более простой по составу среде 5С поверхностным способом (30 сут), а затем полученную ткань переносили в жидкую среду 5Сж или РЖ и культивировали в условиях глубинного выращивания на протяжении четырех пассажей (варианты 5Сж (5С) и РЖ (5С)). В качестве контроля для сравнения использовали ткань штамма *K-27*, постоянно растущую на безгормональной твердой среде 10С. Обобщенная схема эксперимента представлена на рис. 1.

Использованные в ходе экспериментов среды отличались от стандартной для штамма *K-27* среды 10С по содержанию микро- и макросолей, сахара и витамина В₁, а также по консистенции: в частности, применяли твердые среды с добавлением агара (5С) и жидкие — без него (10Сж, 5Сж и РЖ).

Таблица 2

Основные отличия в составе питательных сред, применяемых для выращивания культуры тканей *R. serpentina*

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

Примечание. В состав твердых сред для поверхностного выращивания дополнительно вносили 8—9 г/л агара.

Основные отличия в составе сред представлены в табл. 2. Так, в средах 5С и РЖ было снижено содержание сахара соответственно в 2 и 4 раза. Кроме того, в 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 генома культивируемых тканей использован метод RAPD-ПЦР, позволяющий охватить достаточно большое количество участков, случайным образом распределенных по всему геному. В ходе предварительных исследований подобраны 10-нуклеотидные праймеры с произвольной последовательностью, которые обеспечивали образование четких воспроизводимых спектров амплификации, выявлявших межвидовой полиморфизм у представителей рода *Rauwolfia* (Андреев, Спиридонова, неопубликованные данные). В данной работе использованы 25 праймеров, спектр продуктов которых для ДНК клеточной линии К-27 представлен набором фрагментов от трех до 16, в среднем 9,9 ампликона на праймер (табл. 1). Всего при анализе полученных электрофореграмм учтены 242 четко выраженных воспроизводимых ампликона. Продукты амплификации имели размеры 200—2000 п. н. и были представлены в спектрах мажорными и минорными фрагментами. Сумма мажорных фрагментов составила 103, что соответствует 42,6 % от общего количества ампликонов (табл. 1).

Полиморфизм между исследованными вариан-

тами культивируемых тканей был обнаружен в спектрах ПЦР-продуктов восьми праймеров (табл. 3). При анализе электрофореграмм выделены 10 полиморфных фрагментов (4 %). Большинство найденных отличий заключалось в изменении количества отдельных ампликонов, с помощью двух праймеров выявлено также появление двух новых продуктов. При этом вариabельными были преимущественно минорные фрагменты — определен всего один случай полиморфизма мажорного фрагмента. Образцы спектров, содержащих полиморфные ампликоны, представлены на рис. 2.

В результате оценки полученных данных показано, что во всех случаях изменение условий выращивания приводит к вариabельности ПЦР-продуктов. Анализируемые варианты культивируемых тканей штамма К-27 отличаются между собой по уровню полиморфизма (табл. 3). Наименьший уровень отличий отмечен при выращивании на средах 5С и 10Сж (в обоих случаях изменение количества одного минорного фрагмента), наибольший — для вариантов РЖ (5С) и РЖ (10С), у которых наблюдали количественные изменения шести ампликонов (в том числе одного мажорного). Кроме того, у варианта РЖ (10С) обнаружен новый минорный фрагмент, отсутствующий в спектре ПЦР-продуктов исходного штамма и у варианта РЖ (5С). Варианты 5Сж (5С) и 5Сж (10С) характеризуются несколько более низким уровнем отличий от контроля по сравнению с вариантами, выращенными на среде РЖ: в их RAPD-спектрах

Таблица 3
Изменяемость спектра ПЦР-продуктов в культуре тканей штамма K-27 *R. serpentina*

Вариант	Праймер								Количество полиморфных ампликонов	
	A-01	A-03	A-12	A-13	A-16	A-19	R-01	B-04	Абсолютное	Относительное, %
5С							1↓		1	0,4
10Сж (10С)		1↓					1↓		2	0,8
5Сж (5С)		1↓			1↑	1↓	1↓		4	1,6
5Сж (10С)		1↓		1↑	2↑; 1+	1↓	1↓		7	2,8
РЖ (5С)	1↓	1↓	*1↓	1↑		1↓	1↑		6	2,4
РЖ (10С)	1↓	1↓	*1↓	1↑		1↓	1↑	1+	7	2,8

Примечание. «+» — появление фрагмента; ↓, ↑ — снижение и увеличение копийности фрагмента; *изменения мажорных фрагментов.

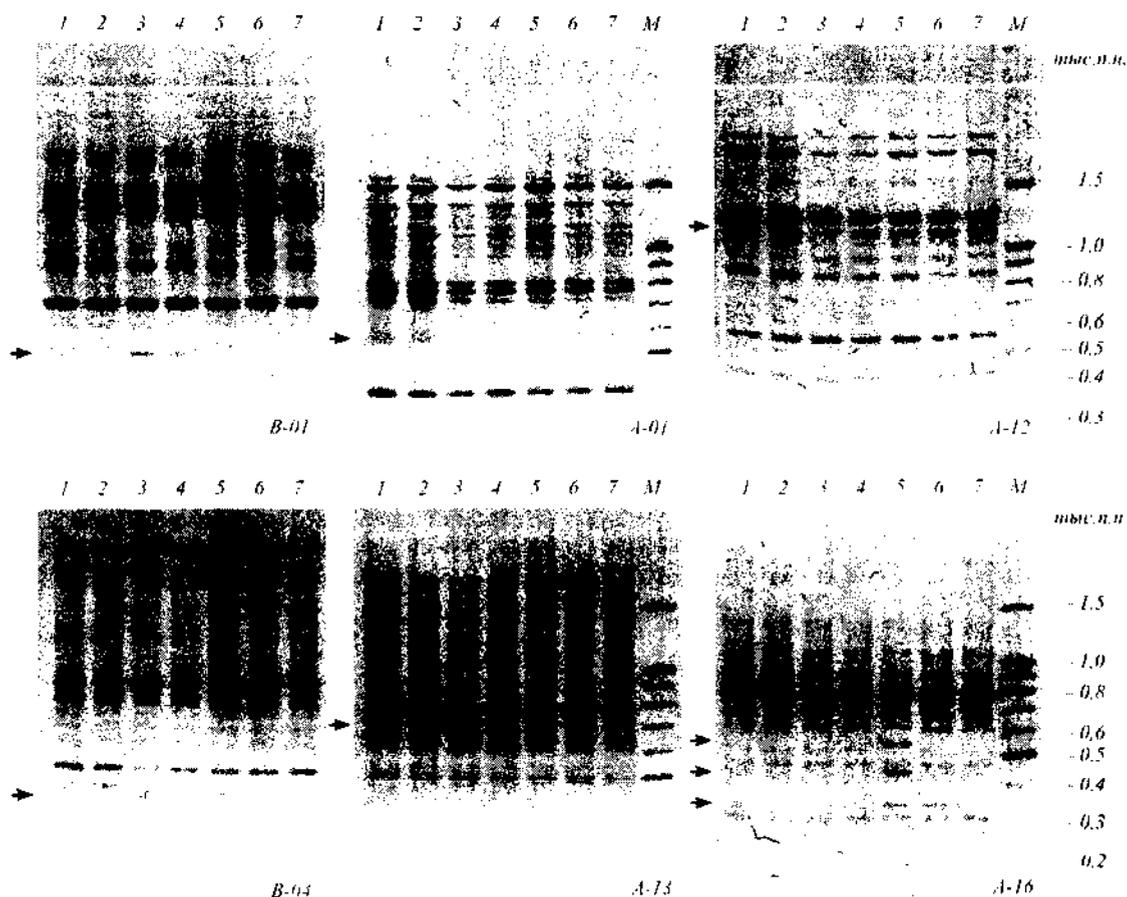


Рис. 2. Модификации RAPD-спектров вариантов культивируемых тканей *R. serpentina* штамма K-27, полученных в результате изменения состава питательной среды и условий выращивания: 1 — контроль (клеточная линия K-27 (10С)); 2—7 — варианты тканей линии K-27 (см. схему эксперимента на рис. 1): 5С (10С), РЖ (10С), РЖ (5С), 5Сж (10С), 5Сж (5С) и 10Сж (10С) соответственно. М — маркер длин фрагментов ДНК «100 + 1,5 тыс. п. н.». Стрелками указаны варибельные ампликоны, в правом нижнем углу электрофореграмм приведено название праймера

выявлены четыре и семь полиморфных ампликонов соответственно.

Помимо различий в уровне варибельности, индуцированных переносом на среды различного состава, установлено, что предварительное культивирование в течение одного пассажа на среде 5С приводит к снижению количества изменений при последующем глубинном выращивании (табл. 3). Так, введение промежуточного пассажа на среде 5С при переходе со среды 10С на среду 5Сж вызывало уменьшение количества полиморфных фрагментов с семи до четырех, а при переносе со среды 10С на среду РЖ эта манипуляция снижает количество полиморфных фрагментов с семи до шести.

Следует отметить, что для большинства полиморфных фрагментов наблюдаются однотипные количественные изменения у нескольких вариантов штамма К-27. Количество некоторых варибельных ампликонов, а именно — полученных с праймерами А-03, А-13 и А-19 изменялось подобным образом в вариантах, культивированных на средах 5Сж и РЖ. Один из полиморфных ампликонов, полученный с праймером В-01, оказался варибельным во всех исследованных вариантах штамма К-27, однако при культивировании на среде РЖ его количество возрастало, а в остальных случаях, наоборот, снижалось. Другие полиморфные ампликоны оказались специфичными и способными отличать варианты, культивировавшиеся на средах 5Сж и РЖ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменение условий выращивания, в частности, минерального состава, содержания сахара и типа среды (жидкая, твердая) сопровождается перестройками генома сформированного штамма К-27 культивируемых тканей *R. serpentina* на молекулярном уровне, которые детектируются в виде полиморфизма ПЦР-фрагментов, полученных с произвольными праймерами. На основании оценки количества варибельных ПЦР-продуктов у вариантов штамма К-27, выращенных в разных условиях, можно выделить следующие особенности обнаруженных перестроек генома. Даже при переводе культивируемых тканей в жидкую среду без изменения ее состава и дальнейшем глубинном выращивании в течение четырех пассажей наблюдаются небольшие изменения в спектрах RAPD-фрагментов. В то же время при поверхностном выращивании на твердой среде 5С уровень варибельности

значительно ниже, чем в случае глубинного выращивания в жидкой среде 5Сж. При глубинном выращивании в жидких питательных средах 5Сж и РЖ уровень отличий от исходного штамма оказался сопоставимым, несмотря на существенные отличия в составе этих сред по количеству сахара и минеральному составу (соотношению азота в виде NH_4^+ - и NO_3^- -групп). В целом это позволяет считать, что переход от поверхностного выращивания к глубинному оказывает более сильное стрессовое воздействие на геном культивируемых тканей, чем изменение состава питательной среды. Вполне вероятно, что обусловлено это, в первую очередь, прямым контактом клеток с компонентами питательной среды в условиях глубинной культуры, тогда как при выращивании на твердой среде с ней соприкасается лишь часть клеток. Определенный вклад в стрессовое воздействие могут вносить также постоянное перемешивание и степень аэрации жидкой среды.

Во-вторых, хотя уровень изменений в условиях глубинного выращивания тканей линии К27 (10С) в средах 5Сж и РЖ оказался сравнимым, введение дополнительного пассажа на среде 5С, предшествующего выращиванию в жидкой среде, заметно снизило изменчивость генома лишь у варианта, пассировавшегося на 5Сж. Таким образом, предварительное культивирование на твердой среде промежуточного по содержанию некоторых компонентов состава, в частности сахарозы (табл. 2), позволяет ослабить стрессовое воздействие, связанное с одновременным изменением состава и консистенции среды. Этот результат имеет важное значение, поскольку показано, что введение промежуточного пассажа на среде 5С при переходе к глубинному выращиванию в жидкой среде позволяет также повысить выход аймалина по сравнению с прямым переносом со среды 10С [3, 4].

Полиморфизм спектров ПЦР-фрагментов вариантов штамма К-27, выращиваемых в разных условиях, обнаруживает еще одну интересную особенность — в большинстве случаев он проявляется в виде изменения количественной представленности минорных фрагментов. С одной стороны, это можно объяснить повышенной лабильностью геномных локусов, дающих при амплификации минорные ПЦР-фрагменты. Но более вероятным кажется следующее предположение. Штамм К-27 представляет собой гетерогенную клеточную популяцию [1, 5] и было показано, что изменение

условий культивування, в частині, перевод на більш бідні по складу або рідкі середовища може призводити до зміни генетичної структури клітинних популяцій, в тому числі до зміни відносного кількості клітин різних рівнів плоидності [1]. В такому випадку виявлений поліморфізм продуктів ПЦР відображає зміни кількісного співвідношення клітин, що містяться в геномі різних варіантів RAPD-локусів. Тоді отримані результати можна трактувати не тільки як відображення перестроек геному, індуктованих зміною умов культивування, але і як наслідок зміни напрямленості селективного тиску. Як би то не було в дійсності, отримані дані свідчать про достатню високу рівень генетичної стабільності протягом тривалого часу культури штамму K-27 раувольфії змієної при зміні умов вирощування.

Висновки. Зміна умов вирощування протягом тривалого часу культури штамму K-27 раувольфії змієної призводить до суттєвих перестроек геному на молекулярному рівні. При зміні умов вирощування з поверхневого на глибоке відбувається більш сильне вплив на геном культивованих тканин порівняно зі зміною складу живильного середовища. Додатковий пасаж на твердому середовищі проміжного складу, що передуватиме переходу до глибокої культури, дозволяє знизити рівень генетичних змін.

K. V. Spiridonova, D. M. Adnof, I. O. Andreev, V. A. Kunakh

Stability of the genome of highly productive *Rauwolfia serpentina* Benth. K-27 cell line at changing maintenance conditions

Summary

Genetic analysis of the tissues of long-term passaged strain K-27 of *R. serpentina*, maintained as surface or submerged cultures on the media of different composition for 4 passages, has been carried out via RAPD-PCR. Changes in the maintenance conditions were found to result in minor rearrangements of strain K-27 genome at the molecular level. However, the switch from the surface maintenance to the submerged one appears to affect the genome of cultured tissues more significantly as compared with the changes in the nutrient medium composition. Introduction of the additional subculture on the agarified medium of the intermediary composition preceding to the switch to submerged culture seems to allow reducing the level of genome changes.

Keywords: plant tissue culture, *Rauwolfia serpentina*, plant genome, RAPD-analysis.

K. V. Spiridonova, D. M. Adnof, I. O. Andreev, V. A. Kunakh

Stability of the genome of highly productive *Rauwolfia serpentina* Benth. K-27 cell line at changing maintenance conditions

Резюме

Методом RAPD-ПЦР здійснено генетичний аналіз тканин тривало пасивованого штамму K-27 *R. serpentina*, які вирощували за умов поверхневої та глибокої культури на різних за складом середовищах протягом чотирьох пасажів. Встановлено, що зміна умов вирощування не спричиняє істотних перебудов геному штамму K-27 на молекулярному рівні. При цьому зміна умов вирощування з поверхневого на глибоке сильніше впливає на геном культивованих тканин порівняно зі зміною складу живильного середовища. Додатковий пасаж на твердому середовищі проміжного складу, що передуватиме переходу до глибокої культури, дозволяє знизити рівень генетичних змін.

Ключові слова: культура тканин рослин, *Rauwolfia serpentina*, геном рослин, RAPD-аналіз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.—К.: Логос, 2005.—724 с.
2. Kunakh V. A., Alkhimova E. V. *Rauwolfia serpentina*: In vitro culture and the production of ajmaline // Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and aromatic plants II / Ed. Y. P. S. Bajaj.—Berlin, Heidelberg: Springer, 1989.—Vol. 7.—P. 398—416.
3. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змієної при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка.—2006.—№ 2.—С. 149—156.
4. Мирюта Н. Ю., Аль-Аммури Ю., Ревакина О. Ю., Можилевская Л. П., Кунах В. А. Изменчивость параметров продуктивности при поверхностном и глубинном выращивании каллусных тканей раувольфии змієної — продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология.—2006.—№ 4.—С. 64—73.
5. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somaclonal variation in crop improvement / Ed. Y. P. S. Bajaj.—Berlin, Heidelberg: Springer, 1996.—Vol. 36.—P. 315—332.
6. Воллосович Н. Е., Воллосович А. Г., Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность // Растит. ресурсы.—1976.—№ 4.—С. 578—583.
7. А. с. СССР № 1167895. Питательная среда для выращивания культуры ткани раувольфии змієної продуцента алкалоидов / А. Г. Воллосович, Т. Ю. Мартынова, С. Я. Полищук // Заявл. 08. 03. 1985 (Неопубл.).
8. Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А. Оптимизация состава макросолей для культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растит. ресурсы.—1979.—№ 4.—С. 516—528.
9. Каухова И. Е., Воллосович А. Г., Цыганков В. А. Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змієної (*Rauwolfia serpentina* Benth.). // Растит. ресурсы.—1981.—№ 2.—С. 217—224.
10. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена.—М.: Мир, 1991.—408 с.

УДК 575.22 + 576.5:582.937

Надійшла до редакції 27.11.06