



УДК 575.22+576.5:582.937

© 2007

И. О. Андреев, Д. М. Адноф, Е. В. Спиридонова,
член-корреспондент НАН Украины В. А. Кунах

Стабильность генома высокопродуктивных клеточных линий раувольфии змеиной при длительном выращивании *in vitro*

Genetic analysis of the tissues from long-term cultured Rauwolfia serpentina cell lines has been carried out through RAPD-analysis. RAPD-markers used were found to allow differentiating the involved strains. The established strains were shown to maintain the genetic stability for a long time upon the growth under standard conditions. A change in culture conditions and the medium composition, in particular, may induce genome alterations in cells of the established strain.

Характерной особенностью культуры клеток растений является высокий уровень изменчивости, получившей название соматклональной [1]. Эта изменчивость проявляется на уровне не только кариотипа, но также ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК (см., напр., [2, разд. 7]). Основная масса работ по соматклональной изменчивости посвящена анализу генетического полиморфизма растений-регенерантов. В то же время изучение генетической изменчивости в каллусных культурах ограничивается преимущественно цитологическими исследованиями, результаты которых свидетельствуют о высокой гетерогенности клеточных популяций *in vitro* (см. [2, разд. 7]). Мы представляем результаты молекулярно-генетического анализа уникальных клеточных линий и штаммов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth., полученных из каллусной ткани, введенной в культуру *in vitro* в 1964 г. Р. Г. Бутенко, которые свидетельствуют об их высокой генетической стабильности при выращивании в стандартных условиях.

Материалом для исследований служили клеточная линия А и созданные на ее основе четыре высокопродуктивных штамма: суспензионная культура R-31 и каллусные штаммы М, К-20 и К-27. Эти штаммы характеризуются стабильно высоким уровнем накопления индолиновых алкалоидов в течение более 25 лет выращивания и представляют практический интерес для медицинской промышленности в качестве источника сырья для получения аймалина. Генеалогия, процедура получения, условия выращивания, в том числе состав используемых питательных сред, продуктивность, цитологические и биохимические особенности этих штаммов подробно описаны в работах [3–5]. Исследовали ДНК, выделенные из

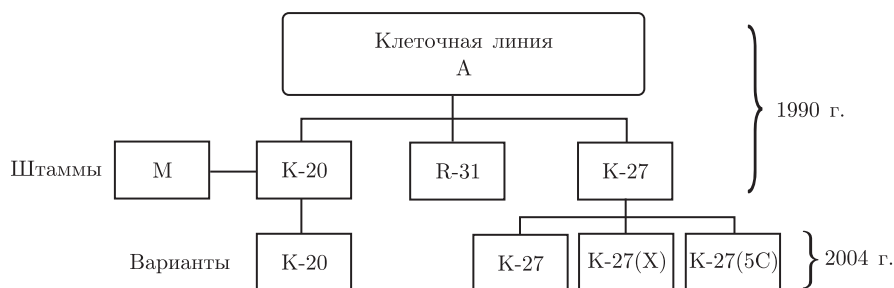


Рис. 1. Схема генеалогических взаимосвязей изученных клеточных линий и штаммов культивируемых тканей *R. serpentina*. Справа указано время отбора образцов для анализа

тканей одних и тех же линий и штаммов в 1990 и в 2004 гг. Для штамма К-27 помимо тканей, выращиваемых в коллекции клеточных культур Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, изучены также варианты: К-27(X) — культивировался в условиях промышленного выращивания на Харьковском химфармобъединении “Здоровье” в 1988–1998 г. и далее в коллекции клеточных культур Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, а также К-27(5С) — ткань штамма К-27, которая была переведена на питательную среду 5С и культивировалась на ней в течение 3 лет, т. е. 30 пассажей (рис. 1).

ДНК из культивируемых тканей выделяли по стандартной методике [6]. Для исследования генома применяли метод RAPD-ПЦР, который позволяет охватить большое количество участков, случайным образом распределенных по всему геному. Использовали 25 десятинуклеотидных праймеров с произвольной последовательностью, которые ранее успешно выявляли межвидовой полиморфизм представителей рода *Rauwolfia* (И. О. Андреев, К. В. Спиридонова, неопубликованные данные) и, следовательно, позволяют оценивать переменные участки исследуемого генома. ПЦР с каждым праймером проводили в двух повторностях. Последовательности праймеров и условия проведения реакции амплификации описаны в работе [7]. Продукты амплификации разделяли в 1,7% агарозном геле с бромистым этидием в 1×ТВЕ-буфере.

Продукты амплификации имели размер в диапазоне 200–2000 п. н. При анализе электрофореграмм учитывали только четко различимые и воспроизводимые в повторных реакциях фрагменты. Всего было учтено 260 ампликонов, 37 из которых (14,2 %) обнаруживали полиморфизм между исследованными объектами. Полиморфизм проявлялся в виде отличий, связанных с наличием отдельных полос, а также вариациями их количественного содержания (копийности) в спектрах ПЦР-продуктов (рис. 2). При сравнении спектров количественные вариации учитывали только в случае не менее 3–4-кратных различий в интенсивности флуоресценции ампликонов. Характеристики 13 RAPD-праймеров, выявивших полиморфизм, и их ПЦР-продуктов представлены в табл. 1. Наиболее переменными оказались спектры ампликонов, полученных с праймерами А11, А16, А19 (см. рис. 2), а также В08.

Для количественной оценки степени полиморфизма, определения уровня дивергенции изученных штаммов от исходной клеточной линии А, а также их изменений при длительном выращивании *in vitro* данные обработки электрофоретических спектров ПЦР-продуктов были записаны в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие одинаковых по размеру фрагментов в спектре, а также их резкие отличия по копийности обозначали соответственно как “1” или “0”. На основе составленных матриц для каждой пары генотипов с помощью компьютерной программы PopGene [8] были рассчитаны генети-

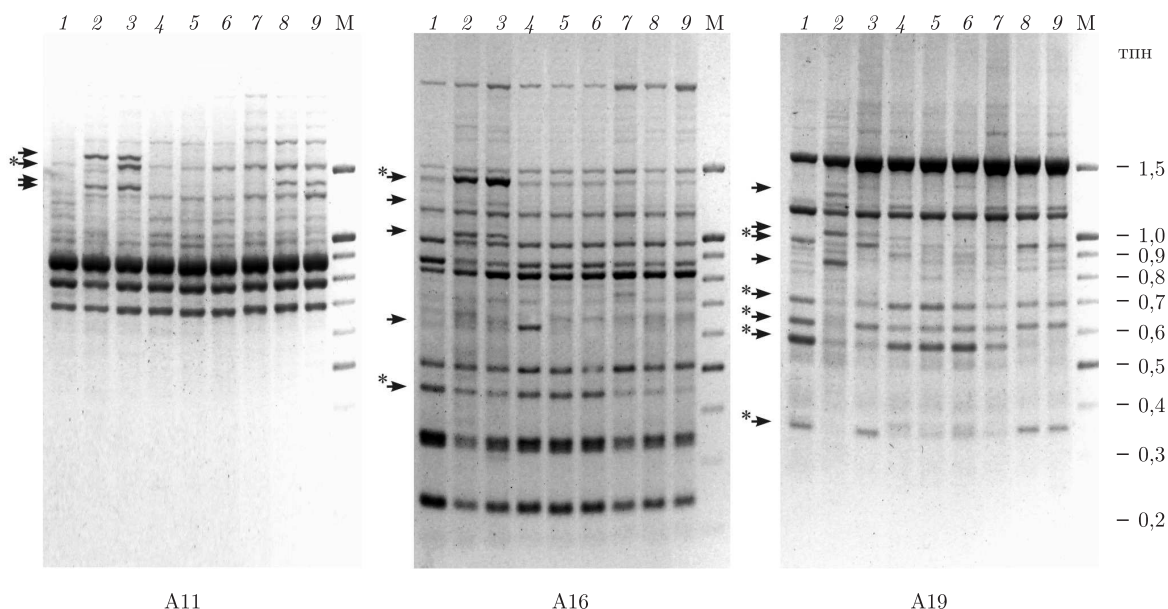


Рис. 2. Вариабельность RAPD-спектров клеточных линий и штаммов культивируемых тканей *R. serpentina*, полученных на основе клеточной линии А.

1 — суспензионный штамм R-31; 2 — клеточная линия А; 3 — штамм М; 4 — штамм К-27, 1990 г.; 5 — штамм К-27, 2004 г.; 6 — К-27(Х), 2004 г.; 7 — К-27(5С), 2004 г.; 8 — штамм К-20, 1990 г.; 9 — штамм К-20, 2004 г.

М — маркер длин фрагментов ДНК “100 bp+1,5 kb”. Стрелками указаны вариабельные ампликоны, звездочками отмечены ампликоны с вариабельностью по копияности; названия праймеров приведены под электрофореграммами

ческие различия (по Нею и Ли) и методом невзвешенной попарно-групповой кластеризации (UPGMA) построена дендрограмма отношений между клеточными линиями *R. serpentina* (рис. 3).

Таблица 1. Характеристика RAPD-праймеров, выявляющих полиморфизм среди штаммов культивируемых тканей *R. serpentina*

№ п/п	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Количество ампликонов	Количество полиморфных ампликонов
1	A01	CAGGCCCTTC	15	2
2	A11	CAATCGCCGT	11	4
3	A12	TCGGCGATAG	12	2
4	A16	AGCCAGCGAA	20	5
5	A17	GACCGCTTGT	12	1
6	A18	AGGTGACCGT	13	1
7	A19	CAAACGTCCG	10	8
8	B01	GTTTCGCTCC	11	1
9	B04	GGACTGGAGT	11	1
10	B05	TGCGCCCTTC	11	1
11	B07	GGTGACGCAG	10	3
12	B08	GTCCACACGG	9	6
13	B10	CTGCTGGGAC	10	2
Всего				37

	Штаммы и их варианты	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	А (1990)	**								
2	R-31 (1990)	0,123	**							
3	М (1990)	0,039	0,088	**						
4	К-27 (1990)	0,076	0,059	0,068	**					
5	К-27 (2004)	0,072	0,055	0,064	0,004	**				
6	К-27(X) (2004)	0,076	0,059	0,059	0,008	0,004	**			
7	К-27(5С) (2004)	0,068	0,076	0,051	0,023	0,019	0,016	**		
8	К-20 (1990)	0,088	0,080	0,047	0,051	0,047	0,043	0,027	**	
9	К-20 (2004)	0,088	0,080	0,047	0,051	0,047	0,043	0,027	0,000	**

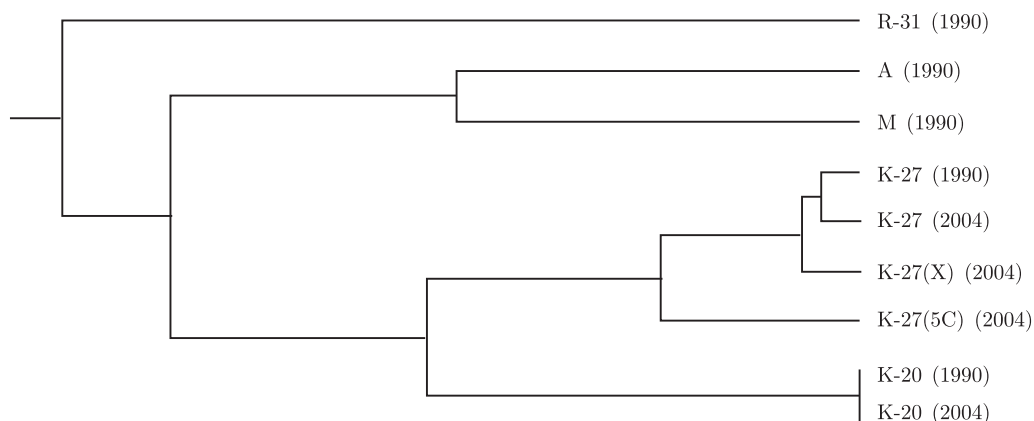


Рис. 3. Генетические различия по Нею и Ли (таблица) и дендрограмма взаимоотношений между штаммами и вариантами культивируемых тканей *R. serpentina* по результатам RAPD-анализа

Как показывают проведенные расчеты, генетические различия между штаммами культивируемых тканей *R. serpentina* и клеточной линией А варьируют от 0,039 до 0,123. Наибольшим подобием с исходной линией А характеризуется линия М, наибольшими отличиями — суспензионный штамм R-31. Уровень отличий между отдельными штаммами колеблется в несколько более узком диапазоне — от 0,047 до 0,088. При сравнении образцов ДНК, выделенных в 1990 и 2004 гг., для штамма К-20 отличий не обнаружено, для К-27 они были существенно ниже отличий между отдельными штаммами. При этом ткани штамма К-27, которые поддерживали в коллекции клеточных культур Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, имели наименьший уровень отличий от варианта 1990 г.; более отдаленными оказались ткани, выращивавшиеся на среде 5С (К-27(5С)); ткани, возвращенные в коллекцию с Харьковского химфармобъединения “Здоровье” (К-27(X)), занимали промежуточное положение (см. таблицу генетических расстояний на рис. 3).

Получение суспензионного штамма R-31 на первых этапах включало селекцию по признакам “прирост биомассы” и “размер клеточных агрегатов” при выращивании в жидкой среде РЖ с последующим клонированием полученных мелких клеточных агрегатов и отдельных клеток на твердой среде с фитогормонами. В дальнейшем клоны, отобранные по признакам “прирост биомассы” и “содержание индолиновых алкалоидов”, были вновь пере-

ведены в исходную жидкую среду, а наиболее продуктивный из клонов стал родоначальником штамма R-31 [4]. Штамм K-20 получен в результате селекции на средах с высоким содержанием антиметаболита 5-метилтриптофана (5-МТ). Штамм M представляет собой результат повторной селекции на средах с 5-МТ тканей наиболее продуктивного варианта штамма K-20 [3]. Штамм K-27 получен после обработки тканей линии A мутагеном этиленимином и последующей селекции по признакам “прирост биомассы” и “содержание индолиновых алкалоидов” на специально разработанной питательной среде [5].

Генетические расстояния, рассчитанные на основании проведенного RAPD-анализа, в целом согласуются с генеалогией изученных штаммов. При получении этих штаммов использовали однотипные критерии селекции: быстрый прирост биомассы в культуре *in vitro* и высокое содержание индолиновых алкалоидов, — и это должно было привести к отбору клеток, обладающих рядом общих признаков. С другой стороны, между штаммами обнаружены отличия, которые, по всей видимости, обусловлены особенностями условий культивирования — все изученные клеточные линии выращиваются на питательных средах разного состава. Хотя не исключено, что характер мутагенного воздействия конкретных условий *in vitro*, применявшихся при получении каждого штамма, также внес свой вклад в формирование определенного типа клеток, которые наряду со специфическими цитогенетическими и биохимическими характеристиками обладают также индивидуальным молекулярно-генетическим портретом.

RAPD-анализ ДНК, выделенной с интервалом в 14 лет из тканей штаммов K-27 и K-20, показал, что культивирование в стабильных условиях в течение столь длительного промежутка времени не приводит к существенным генетическим изменениям. Ткани штамма K-27, которые выращивали в стандартных условиях на Харьковском химфармобъединении “Здоровье” с 1988 по 1998 гг. в качестве источника сырья для промышленного производства аймалина и затем были возвращены в коллекцию отдела, также характеризуются весьма незначительным уровнем отличий от тканей коллекционного штамма. Культивирование в течение трех лет на среде другого состава привело к более заметным изменениям генома (вариант K-27(5C)). Однако даже в этом случае генетические различия с исходным штаммом K-27 были в 2–4 раза меньше отличий между исследованными штаммами, полученными на основе линии A. Следует также отметить, что все обнаруженные у варианта K-27(5C) изменения RAPD-спектров проявлялись в изменении копийности отдельных ПЦР-продуктов. Поскольку ранее было показано, что исследованные штаммы представляют собой гетерогенные популяции, сформированные клетками разных уровней пloidности [3, 4] (см. также [2, разд. 10]), такие количественные вариации могут быть обусловлены изменением генетической структуры клеточной популяции, в частности относительного количества различных типов клеток в составе штамма.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы. Используемые в работе RAPD-маркеры дают возможность дифференцировать на молекулярно-генетическом уровне штаммы культивируемых тканей *R. serpentina*. Культивирование сформированных штаммов в стандартных для них условиях обеспечивает высокую генетическую стабильность культивируемых тканей на протяжении длительного времени. Смена условий выращивания, в частности состава питательной среды, может вызывать изменения генома клеток сформированного штамма.

1. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // Theor. and Appl. Genet. – 1981. – 60. – P. 197–214.

2. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос, 2005. – 724 с.
3. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Алтатова Л. К., Губарь С. И. Устойчивость к 5-метилтриптофану и накопление алкалоидов в каллусной культуре раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. // Биотехнология. – 2001. – № 3. – С. 3–10.
4. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и продуктивность суспензионных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. in vitro // Там же. – 2001. – № 4. – С. 9–21.
5. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка. – 2006. – 22, № 2. – С. 149–156.
6. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – Москва: Мир, 1991. – 408 с.
7. Спиридонова Е. В., Адноф Д. М., Андреев И. О., Кунах В. А. Изменение условий выращивания существенно не влияет на геном высокопродуктивной клеточной линии К-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. // Биополимеры и клетка. – 2007. – 23, № 2. – С. 86–92.
8. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. POPGENE. Ver. 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada. – 1999.

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 14.03.2007

УДК 578

© 2007

О. А. Артеменко, член-корреспондент НАН Украины Є. Л. Кордюм

Експресія генів δ -циклінів у кореневій меристемі проростків гороху (*Pisum sativum* L.) за умов кліноостатування

*By the methods of hybridization in situ and RT-PCR, we show, for the first time, the expression of genes of $\delta 1$ - and $\delta 3$ -cyclins in cells of the root meristem of pea (*Pisum sativum* L.) under slow horizontal clinorotation and stationary conditions of growing. We detect the clinorotation effect on the expression of genes of $\delta 3$ -cyclin after 24 h of the wetting of seeds. The presence of transcripts of this cyclin can be a cause for the prolongation of G1-G1/S phases and, as a result, for the delay of the beginning of DNA replication in this period.*

Цикліни та цикліназалежні кінази (ЦЗК) є одними з основних регуляторів клітинного циклу у тварин та рослин [1]. Виявлено існування декількох класів циклінів, які відповідають за послідовне проходження клітини по фазах циклу. Виділені з *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. δ -цикліни високогомологічні δ -циклінам ссавців, які включають три типи білків — $\delta 1$, $\delta 2$ та $\delta 3$, що регулюють події пресинтетичної фази циклу та вступ у фазу синтезу ДНК [1]. У результаті з'єднання пресинтетичних циклінів з ЦЗК відбувається їх активація та утворюється активний ЦЗК-цикліновий комплекс, який стимулює просування клітини до S-фази. У кінці певного проміжку кожної фази клітинного циклу відбувається деградація відповідних циклінів, що необхідно для переходу до наступного [2]. $\delta 1$ -циклін може бути присутній в клітині протягом усієї пресинтетичної фази циклу, а флуктуації рівня $\delta 3$ -цикліну надають йому додаткові регуляторні властивості [3]. Попередні дослідження впливу