

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

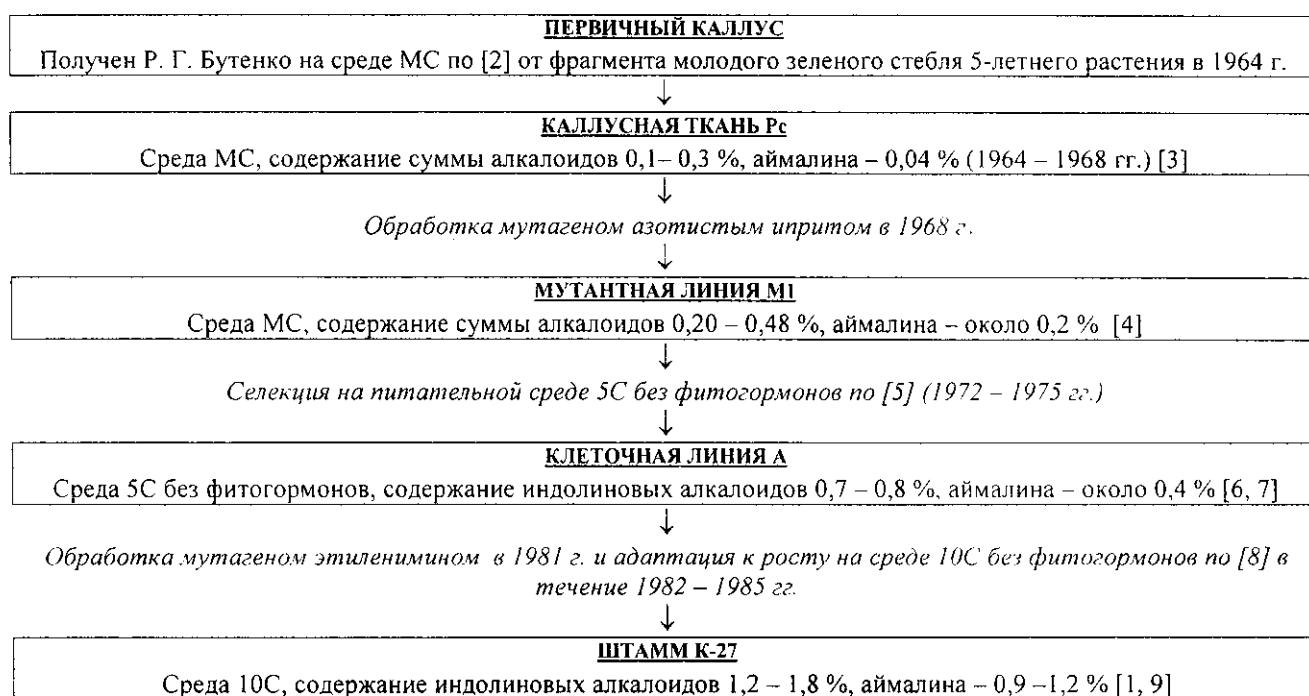
Наиболее продуктивным из известных клеточных культур *R. serpentina* является каллусный штамм К-27. Этот штамм при выращивании на специально разработанной агаризованной питательной среде 10С без фитогормонов, содержащей 10 % сахарозы по [8], накапливает 1,2–1,8 % индолиновых алкалоидов и 0,9–1,2 % аймалина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

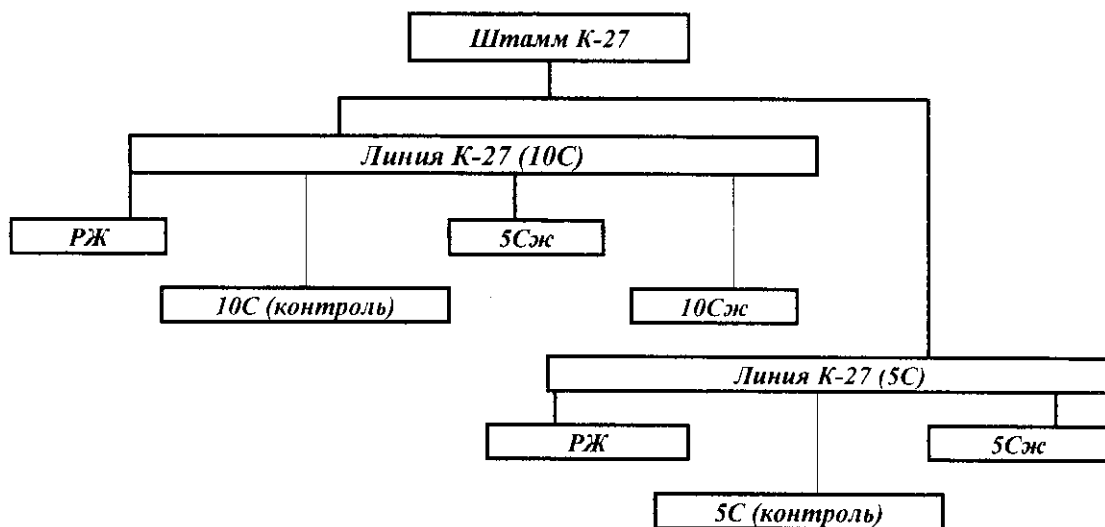
служил гормонезависимый каллусный штамм К-27 *R. serpentina*, продуктивность, генетические и биохимические особенности которого описаны в работах [1, 12]. С 1982 г. штамм выращивается на агаризованной среде 10С по [8] (клеточная линия К-27 (10С)), а с 2000 г. параллельно его выращивают на агаризованной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

ственно 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
K-27 (5С)	5Сж	40	20,4	333
		РЖ	30	10,1
	5С	30	23,7	117
		40	40,2	219
		70	36,3	387
		5Сж	50	20,5
РЖ	40	13,9	267	

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

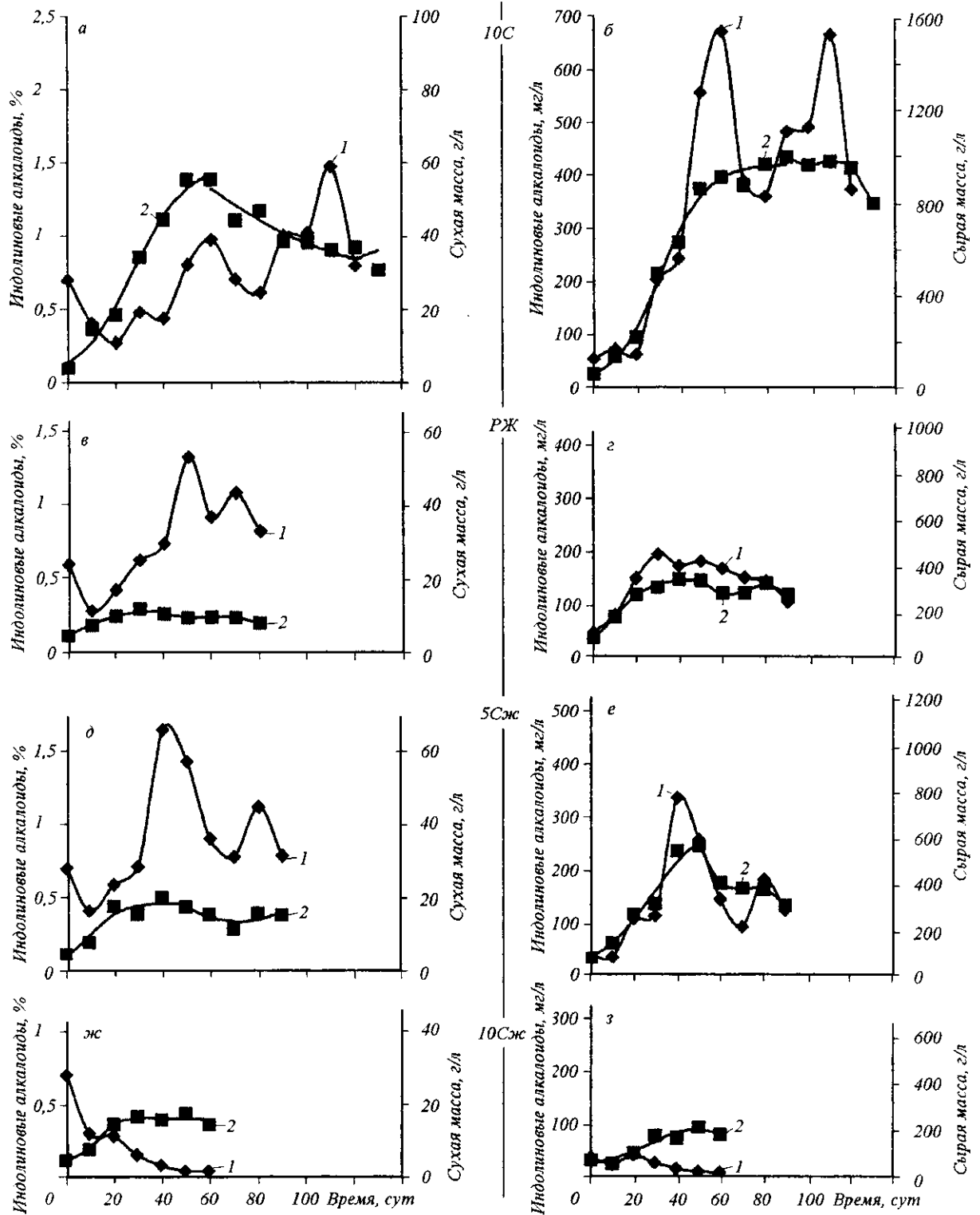


Рис. 1. Динамика накопления индолиновых алкалоидов и биомассы в течение пассажа каллусной ткани линии К-27 (10С) *R. serpentina* при выращивании в разных средах (а, в, д, ж: 1 — содержание алкалоидов в сухой биомассе, %; 2 — выход сухой массы, г/л; б, г, е, з: 1 — выход алкалоидов, мг/л; 2 — накопление 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

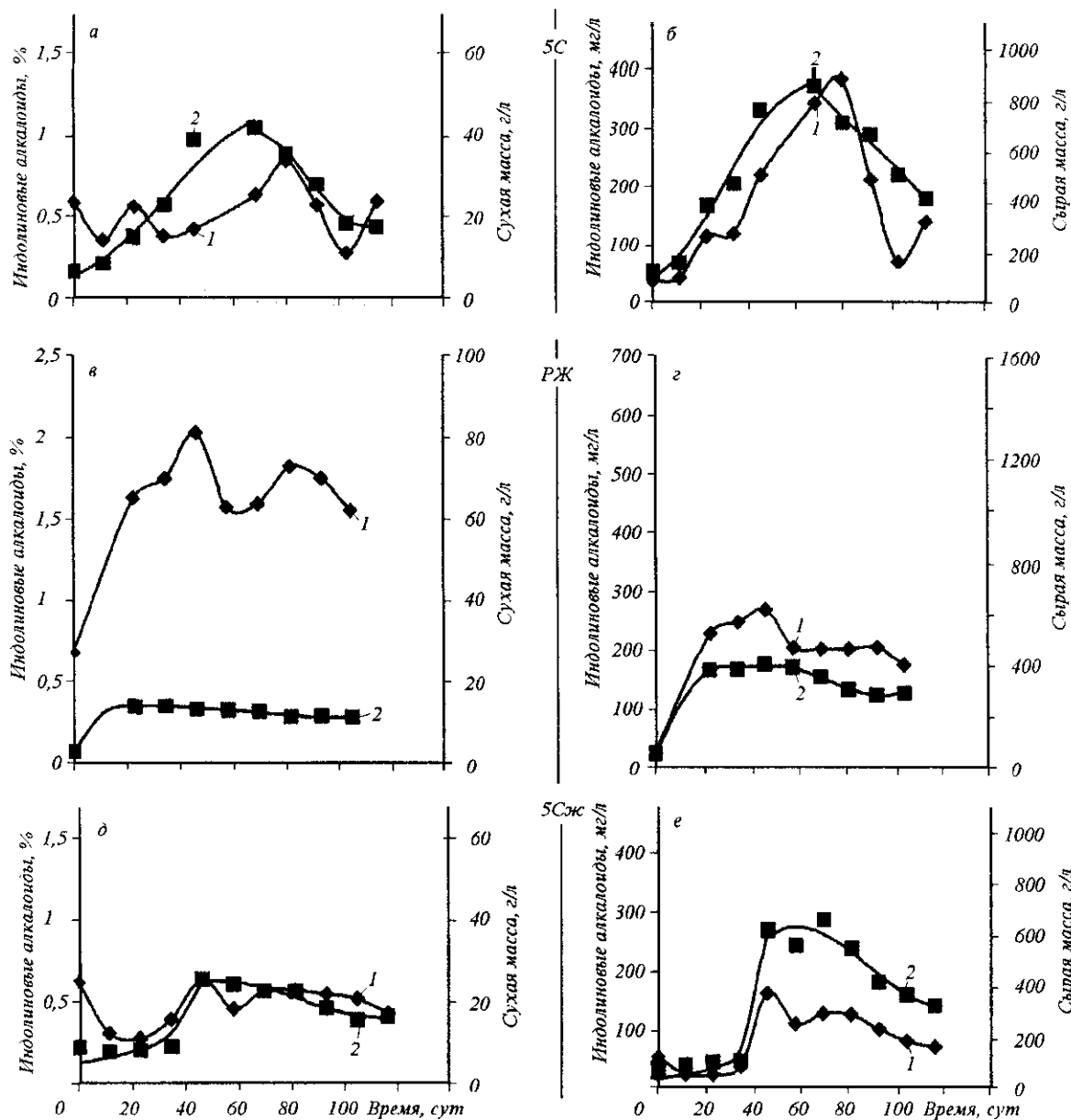


Рис. 2. Динамика накопления индолиновых алкалоидов и биомассы в течение пассажа каллусной тканью линии К-27 (5С) *R. serpentina* при выращивании в разных средах (а, в, д: 1 — содержание алкалоидов в сухой массе, %; 2 — выход сухой массы, г/л; б, г, е: 1 — выход алкалоидов, мг/л; 2 — накопление сырой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

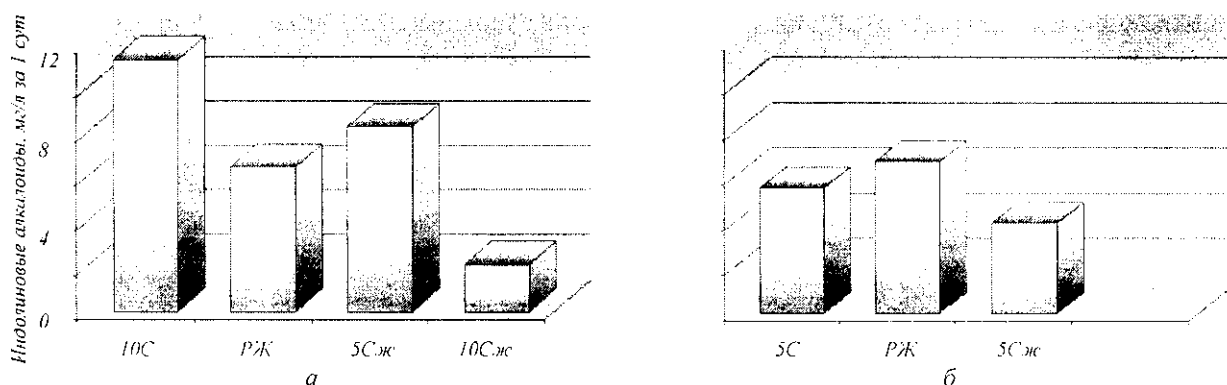


Рис. 3. Скорость накопления индолиновых алкалоидов (мг/л за 1 сут) клеточной линией K-27(10С) (а) и клеточной линией K-27(5С) (б) *Rauwolfia serpentina* в разных условиях выращивания (скорость накопления алкалоидов приведена для точек роста, в которых продуктивность была максимальной): 10С — контроль, 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 ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. 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 раувольфії змеїної як продуцент алкалоїдів // *Культура ізолюваних органів, тканин і кліток рослин.*—М.: Наука, 1970.—С. 253—257.
4. Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Действие азотистого иприта на культуру изолюрованных тканей раувольфії // *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 раувольфії змеїної — продуцента алкалоїдів / 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 раувольфії змеїної *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 раувольфії змеїної (*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 раувольфії с использованием микроколоночной хроматографии // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 5.—С. 78—80.

УДК 615.222:581.143.6
Надійшла до редакції 12.12.05