

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ K-27M КУЛЬТУРИ ТКАНИН *RAUVOLFIA SERPENTINA* З ВИКОРИСТАННЯМ ДІЛЯНКИ BTC1-5,8S-BTC2 ГЕНІВ 35S рРНК

І. О. АНДРЕЄВ *orcid* 0000-0002-3706-8514, І. І. КОНВАЛЮК *orcid* 0000-0003-2283-6063,
В. М. МЕЛЬНИК *orcid* 0000-0002-0084-3142, М. В. ГУМЕНЮК
В. А. КУНАХ *orcid* 0000-0002-9418-3172

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

У відділі генетики клітинних популяцій ІМБГ НАНУ отримано гормонезалежний штам культивованих тканин *Rauvolfia serpentina* K-27M, який є цінним продуцентом індолінових алкалоїдів. Штам істотно відрізняється за складом та вмістом алкалоїдів від інтактних рослин *R. serpentina*. Водночас, відсутні однозначні дані про рослинний матеріал, використаний для його отримання. Метою роботи було встановити видову приналежність культури тканин штаму K-27M на основі молекулярно-генетичного аналізу ділянки BTC1-5,8S-BTC2 генів 35S рибосомної РНК (рДНК). **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція, клонування, сиквенування, філогенетичний аналіз. **Результати.** Ділянку BTC1-5,8S-BTC2 35S рДНК штаму K-27M ампліфікували методом ПЛР із використанням специфічних праймерів. Отримано кілька клонів, два з яких використали для сиквенування. Сиквеновані клони відрізнялися за довжиною внаслідок двох делецій в одному з них, а також за нуклеотидною послідовністю. Наявність делеції в ділянці гена 18S рРНК та численних однонуклеотидних замінів в ділянках генів 18S та 5,8S рРНК у одного з клонів може свідчити про нефункціональність варіанта гена 35S рРНК, з якого він був ампліфікований. Філогенетичний аналіз, проведений із використанням 26 послідовностей ділянки BTC1-5,8S-BTC2 7 видів роду *Rauvolfia*, знайдених у GenBank, показав групування клонів, отриманих з штаму K-27M, в окремий кластер разом з іншими зразками *R. serpentina*. **Висновки.** На основі молекулярно-генетичного аналізу ділянки BTC1-5,8S-BTC2 35S рДНК встановлено приналежність культури тканин штаму K-27M до виду *Rauvolfia serpentina*.

Ключові слова: *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz, культура тканин рослин, молекулярно-генетичні маркери, гени 35S рибосомної РНК, внутрішній транскрибований спейсер (BTC).

Вступ. Раувольфія зміїна (*Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz, род. Аросунасеае) — тропічна чагарникова рослина, яку протягом століть використовували в аюрведичній медицині під назвою *saragandha*, а пізніше і в доказовій медицині через накопичення індолінових алкалоїдів у коренях. Відомо, що ці біологічно активні сполуки мають широкий спектр дії, зокрема, антиаритмічну, гіпотензивну, психотропну, седативну дію (Kumar et al., 2013), також характеризуються антимікробними, протигрибковими, протизапальними, антипроліферативними, антидіуретичними, антихолінергічними й антимутагенними властивостями (Singh et al., 2017).

Нагальна потреба в біологічних сполуках з цієї рослини і обмежений доступ до рослинної сировини спонукали дослідників різних країн скористатися культурою тканин як альтернативним способом отримання якісної рослинної сировини, що дозволяє цілорічно продукувати клітинну біомасу із підвищеним вмістом цінних БАС.

У відділі генетики клітинних популяцій ІМБГ НАНУ завдяки багаторічним дослідженням з клітинної селекції з використанням підтримуючого добору було отримано гормонезалежний високопродуктивний стабільний штам культивованих тканин *R. serpentina* K-27M, суха біомаса якого містить до 1,7 % індолінових (аймаліноподібних) алкалоїдів, у тому числі 0,8 % аймаліну (Kunakh et al., 2023). Генеалогію цього штаму, окремі характеристики вихідної та проміжних клітинних ліній, а також штамів культивованих тканин *R. serpentina* наведено на рис. 1.

Основою для штаму K-27 стала клітинна лінія А, яку шляхом тривалої селекції одержано у Ленінградському хіміко-фармацевтичному інституті (нині Санкт-Петербурзький державний хіміко-фармацевтичний університет, РФ) (Vollosovich et al., 1976).

Зокрема, його попередник — штаму K-27 (Кунах, 2005) наприкінці 1980-х — на початку 1990-х років був впроваджений на Харківському хіміко-фармацевтичному заводі для дослідно-промислового біотехнологічного виробництва аймаліну.

Попередником лінії А була клітинна лінія М1, адаптована А. Г. Воллосовичем до росту на спеціально розробленому безгормональному живильному середовищі 5С (Воллосович и др., 1976). Ця лінія входила до числа інших мутантних ліній, отриманих після обробки азотистим іпритом початкового штаму Рс, індукованого на середовищі МС (Murashige, Skoog, 1962) співробітниками Інституту фізіології рослин ім. К. А. Тімірязєва (Москва, СРСР) (Ковалева и др., 1968).

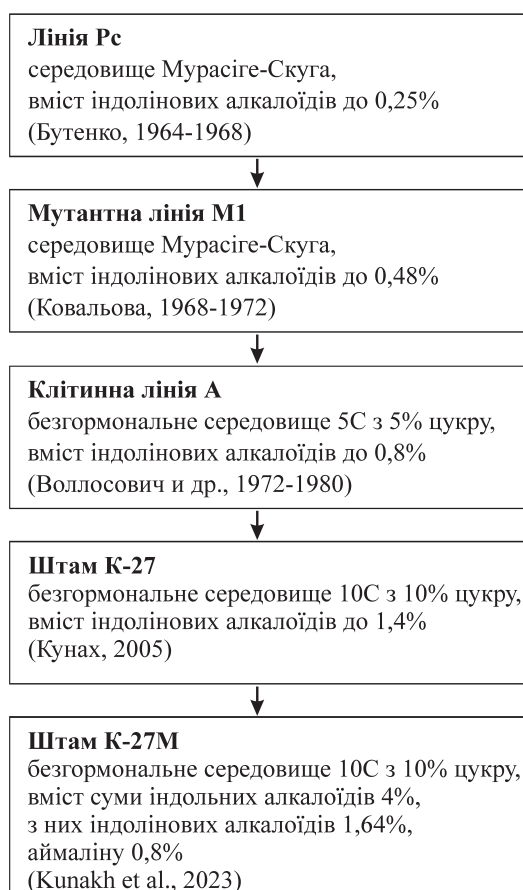


Рис. 1. Генезологія штаму K-27M культури тканин *Rauvolfia serpentina*. Детальна інформація про вищевказані лінії та штами наведена у монографії (Кунах, 2005, с. 411–429).

Таким чином, культуру тканин, від якої походить штаму K-27M, було отримано тривалий час (кілька десятків років) тому, як стверджувалося, з рослинного матеріалу *R. serpentina* (див. Ковалева и др., 1968). Прямих ботанічних підтверджень видової приналежності рослинного матеріалу, використаного в якості експланту для вихідної культури, на теперішній час не збереглося. Водночас, культура тканин штаму K-27M за кількістю і спектром накопичуваних індолінових алкалоїдів істотно відрізняється від інтактних рослин *R. serpentina* (Deshmukh et al., 2012; Kumari et al., 2013), що зумовлює певні сумніви в походженні культури тканин, яка слугувала основою для створення штаму K-27M.

Метою роботи було встановити видову приналежність культури тканин штаму K-27M на основі молекулярно-генетичного аналізу ділянки BTC1-5,8S-BTC2 генів 35S рДНК.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для досліджень була клітинна біомаса штаму K-27M культури тканин *R. serpentina* з колекції культивованих тканин відділу генетики клітинних популяцій ІМБГ НАН України. Умови вирощування штаму, особливості його росту і продуктивності, цитологічні та інші характеристики описано у (Kunakh et al., 2023). Каліус, відібраний на 10 день після пересадки, висушували в термостаті при температурі 37 °С впродовж доби. Висушену тканину подрібнювали в ступці і переносили в пластикову пробірку об'ємом 2 мл, після чого екстрагували ДНК цетавлоновим буфером за описаною раніше методикою (Mishchenko, Andreev, 2023).

Для ампліфікації ділянки BTC1-5,8S-BTC2 35S рДНК використали праймери DAMS18 — GTC CCT GCC GTT TGT ACA CA та ITS28cc — CGC CGT TAC TAG GGG AAT CCT TGT AA, комплементарні до консервативних ділянок, розташованих на 3'-кінці гена 18S рДНК та 5'-кінці гена 25S рДНК, відповідно. Реакційна суміш для полімеразної ланцюгової реакції загальним об'ємом 50 мкл містила 40 нг матричної ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,5 мкМ кожного з праймерів, та 1×ПЛР-буфер ((NH₄)₂SO₄) з 2,0 мМ MgCl₂. Ампліфікацію проводили в термоциклері Techne Prime (Cole-Parmer) у наступному режимі: 95 °С — 3 хв; 25 циклів (94 °С — 20 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 40 с); 1 цикл 72 °С — 5 хв.

Отримані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, вирізали фрагмент необхідного розміру та очищали ДНК від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Виділений фрагмент ДНК лігували в

плазмиду рGEM-T. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Визначення послідовності клонуваних фрагментів ДНК проводили із використанням зворотного M13-праймера у GATC-Biotech (Нідерланди).

Для пошуку гомологічних послідовностей в базі даних GenBank використали програму BLAST (Samacho et al., 2009) з фільтруванням отриманих даних за приналежністю організму до роду *Rauvolfia*. Нуклеотидні послідовності вирівнювали з використанням алгоритму MUSCLE з подальшим уточненням вручну і аналізом у програмі Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Філогенетичну дендрограму будували за допомогою онлайн-додатку W-IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016) методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення і 1000 реплікацій для оцінки бутстреп-підтримки.

Результати і обговорення

Електрофоретичне фракціонування ПЛР-продуктів показало, що в результаті ампліфікації з використаними праймерами ділянки 35S рДНК, що містить BTC1, ген 5,8S рРНК та BTC2, у *R. serpentina* утворюється основний фрагмент розміром близько 900 п.н. та в значно меншій кількості фрагмент розміром близько 850 п.н. (рис. 2).

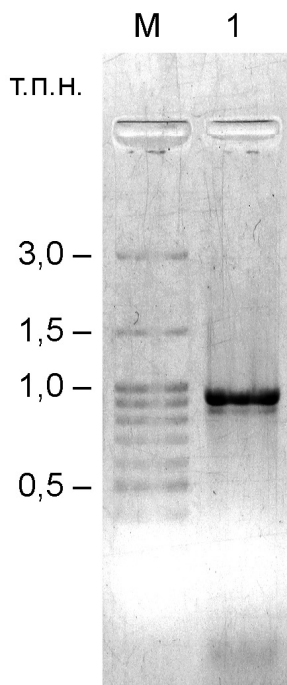


Рис. 2. Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації ділянки BTC1-5,8S-BTC2 35S рДНК *R. serpentina* (1). М — молекулярний маркер, 100bp DNA ladder.

Виділено та клоновано основний фрагмент, а також визначено нуклеотидну послідов-

ність двох клонів. Сиквенування клонуваних послідовностей ПЛР-фрагмента генів 35S рРНК *R. serpentina* показало, що вони відрізняються за довжиною: довжина клону RseITS-1 становила 909 п.н., а RseITS-2 — 873 п.н. Знайдені відмінності були зумовлені наявністю в клоні RseITS-2 двох протяжних делецій, одна з яких довжиною 26 п.н. розташована в 3'-ділянці гена 18S рРНК, а інша довжиною 8 п.н. — в центральній частині BTC2. Загалом рівень подібності двох проаналізованих клонів становив 87 %. Отримані послідовності були депоновані в базу даних NCBI GenBank під номерами PQ793164, PQ793165.

Пошуку бази даних GenBank послідовностей, гомологічних до клону 1, виявив близько 30 послідовностей досліджуваної ділянки, ізольованих із 7 видів роду *Rauvolfia*, включно із *R. serpentina*. Із них 26 були використані для вирівнювання та побудови філогенетичного дерева (рис. 3). Частина послідовностей знайдених в GenBank, зокрема KM887414 та MW019649, а також KM887411, KM887415 і KM887421 у *R. serpentina*; MH558660 і MH558658 у *R. verticillata* виявилися ідентичними між собою. Як зовнішню групу для вкорінення дерева використали *Urceola micrantha* — вид з іншого роду родини Аросунасеае.

Аналіз філогенетичного дерева показав, що всі зразки *R. serpentina* включно із клоном 1, отриманим зі штаму К-27М культури тканин цього виду, формують одну групу, подібність зразків всередині якої варіює в межах 98–99 % (рис. 3). Трохи віддалено від цієї групи, але в тому ж кластері розташований клон 2 зі штаму К-27М, а також два зразки *R. sumatrana*. Ще два відокремлених кластери утворили зразки видів *R. verticillata*, *R. densiflora* і *R. cambodiana*, а також *R. tetraphylla*. Зразок *R. micrantha*, рівень подібності якого з іншими послідовностями не перевищує 62 %, сформував на філогенетичному дереві самостійну гілку.

Ділянку BTC1-5,8S-BTC2, яка входить до складу 35S рДНК, широко використовують як молекулярний маркер у філогенетиці рослин та штрих-кодунні ДНК завдяки унікальному поєднанню у її складі консервативних та варіабельних послідовностей. Консервативні регіони генів 18S, 5,8S та 25S рРНК забезпечують надійну ампліфікацію цієї ділянки або її частин із використанням універсальних праймерів, тоді як послідовності міжгенних спейсерів BTC1 та BTC2 характеризуються мінливістю, рівень якої достатній для розпізнавання близькоспоріднених видів. Завдяки своїй присутності в геномі всіх рослин і підвищеній швидкості еволюції ділянки BTC є ефективним філогенетичним маркером, який дозволяє порівнювати відносно дивергентні таксони (Letsiou et al., 2024).

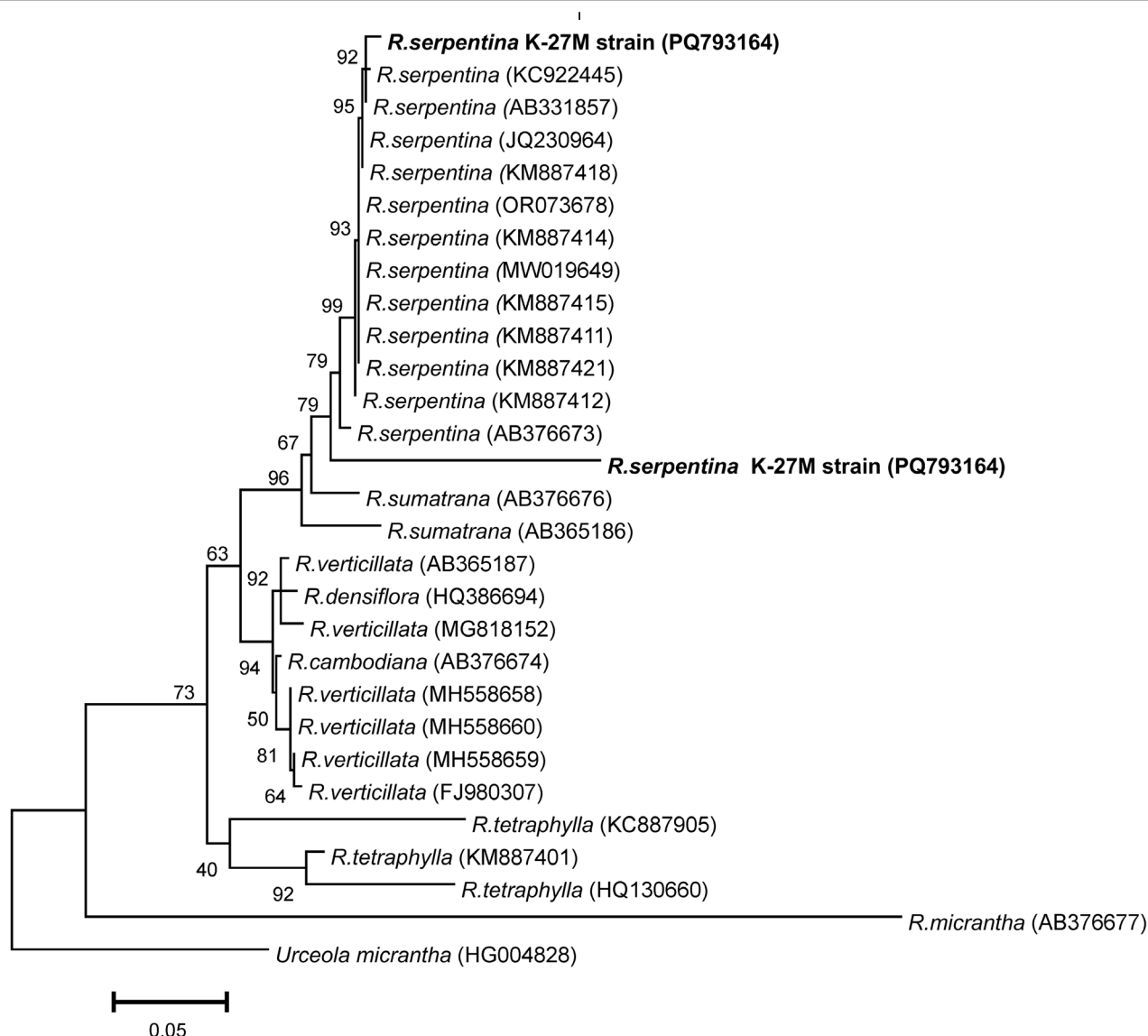


Рис. 3. Філогенетичне дерево видів роду *Rauvolfia*, побудоване на основі ділянки генів 35S рРНК, що містить BTC1, ген 5,8S рРНК та BTC2, за алгоритмом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood). Як зовнішню групу для вкорінення використали *Urceola micrantha*. Жирним шрифтом виділено визначені в цій роботі послідовності BTC1-5,8S-BTC2 штаму культивованих тканин K-27M.

Кілька факторів можуть перешкоджати використанню BTC як універсального ДНК-маркера, серед яких основними є наявність паралогічних генів 35S рРНК, а також труднощі при ампліфікації та секвенуванні, зумовлені існуванням вторинних структур ДНК. Незважаючи на це, BTC широко використовують для ідентифікації квіткових рослин і водоростей. Цікаво, що дослідження ділянки BTC як кандидата для штрих-кодування ДНК рослин показало, що в цілому за роздільною здатністю та універсальністю вона перевершує штрих-коди на основі хлоропластної ДНК (Letsiou et al., 2024).

У цій роботі ми використали ділянку BTC1-5,8S-BTC2 генів 35S рРНК для встановлення

видової приналежності культури тканин штаму K-27M. Було виділено і визначено нуклеотидну послідовність двох клонів цієї ділянки геному, ідентичність яких виявилася порівняно низькою. Наявність делеції в ділянці гена 18S рРНК, а також численних одонуклеотидних замін в кодувальних ділянках генів 18S та 5,8S рРНК (7 та 19, відповідно) у клона RseITS-2 може свідчити про нефункціональність варіанта гена 35S рРНК, з якого був ампліфікований цей клон. Серед зразків *R. tetraphylla*, знайдених у GenBank, ми виявили клон KC887905, який містить 16 нуклеотидних замін в кодувальній ділянці гена 5,8S рРНК і може бути частиною нефункціонального рибосомного цистрону.

Результати проведеного філогенетичного аналізу свідчать про високий ступінь спорідненості штаму K-27M з рослинами виду *R. serpentina*. Послідовності ділянки BTC1-5,8S-BTC2 35S рДНК *R. serpentina*, знайдені у GenBank, були отримані незалежно різними групами дослідників із рослин, які походили з різних частин Азії: Індії, Тайланду та Індонезії (о. Ява). Тим не менше, вони виявилися більш подібними між собою, ніж зразки *R. verticillata* та *R. tetraphylla*. В цілому, отримані результати свідчать про те, що рослинний матеріал, з якого було індуковано вихідну культуру для отримання штаму K-27M, належить до *R. serpentina*.

Висновки

У результаті досліджень отримано два клони ділянки BTC1-5,8S-BTC2 гена 35S рРНК штаму K-27M та визначено їхню нуклеотидну послідовність. Проведено філогенетичний аналіз із залученням послідовностей цієї ділянки інших видів роду *Rauwolfia*, знайденими в базі даних GenBank. На основі молекулярно-генетичного аналізу ділянки BTC1-5,8S-BTC2 генів 35S рРНК встановлено приналежність культури тканин штаму K-27M до виду *Rauwolfia serpentina*.

Фінансування. Дослідження виконано за часткової фінансової підтримки Фонду Сімонса, США (Simons Foundation Support Grant 1290589; Andreev I., Konvalyuk I.).

References

1. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T. L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009. Vol. 10(1). P. 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
2. Deshmukh S. R., Ashrit D. S., Patil B. A. Extraction and evaluation of indole alkaloids from *Rauwolfia serpentina* for their antimicrobial and antiproliferative activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 4(Suppl. 5). P. 329–334.
3. Kovaleva T. A., Shamina Z. B., Butenko R. G. Cytological study of tissue culture of rauwolfia (*Rauwolfia serpentina* Benth.). *Genetica*. 1968. Vol. 4(15). P. 5–13. [In Russian] / Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Цитологическое изучение культуры ткани раувольфии (*Rauwolfia serpentina* Benth.). *Генетика*. 1968. Т. 4, № 15. С. 5–13.
4. Kumari R., Rathi B., Rani A., Tiwari S. M., Bhatnagar S. *Rauwolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: Phytochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013. Vol. 23(2). P. 348–355.
5. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. *Genetic, physiological and biochemical basis*. Kyiv: Logos, 2005. 730 p. [In Ukrainian] / Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. *Генетичні та фізіолого-біохімічні основи*. К.: Логос, 2005. 730 с.
6. Kunakh V. A., Konvalyuk I. I., Mozhylyvska L. P., Bieda O. A., Twardovska M. O., Andreev I. O., Yarmolyuk S. M. Comprehensive study of hormone-independent highly productive strain of *Rauwolfia serpentina* tissue culture as a source of indole alkaloids. *Biopolymers and Cell*. 2023. Vol. 39(4). P. 283–298. doi: 10.7124/bc.000AA7.
7. Letsiou S., Madesis P., Vasdekis E., Montemurro C., Grigoriou M. E., Skavdis G., Moussis V., Koutelidakis A. E., Tzakos A. G. DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences*. 2024. Vol. 14(4). P. 1415. doi: 10.3390/app14041415.
8. Mishchenko A. M., Andreev I. O. Selection and optimization of the method for DNA isolation and purification from *Corylus* species for PCR analysis. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2023. Vol. 32. P. 53–58. doi: 10.7124/FEEO.v32.1535.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15(3). P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Varlamov A., Vaskin Y., Efremov I., German Grehov O.G., Kandrov D., Rasputin K., Syabro M., Tleukenov T. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28(8). P. 1166–1167. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS091.
11. Singh M., Kaur R., Rajput R., Mathur G. Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina*. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*. 2017. Vol. 11(03). P. 132. doi: 10.22377/IJGP.V11I03.1116.
12. Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A., Minh B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44(W1). P. W232–W235. doi: 10.1093/nar/gkw256.
13. Vollosovich N. E., Vollosovich A. G., Kovaleva T. A., Shamina Z. B., Butenko R. G. Tissue culture strains of *Rauwolfia serpentina* Benth. and their productivity. *Rastitel'nyye resursy*. 1976. Vol. 12(4). P. 578–583. [In Russian] / Волосович Н. Е., Волосович А. Г., Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность. *Растит. ресурсы*. 1976. Т. 12, № 4. С. 578–583.

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS
OF RAUVOLFIA SERPENTINA TISSUE
CULTURE STRAIN K-27M
USING THE ITS1-5.8S-ITS2 REGION
OF 35S rRNA GENES**

I. O. Andreev, I. I. Konvalyuk, V. M. Melnyk,
M. V. Humeniuk, V. A. Kunakh

Institute of molecular biology and genetics
of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademik Zabolotny str., 150
e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

Hormone-independent strain K-27M of *Rauvolfia serpentina* tissue culture, which is a valuable source of indoline alkaloids, was created in the Department of genetics of cell populations at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine. This strain differs significantly from *R. serpentina* plants in composition and content of alkaloids. Furthermore, there are no clear data on the plant material used to obtain this tissue culture strain. **The aim** of this study was to carry out species identification of tissue culture strain K-27M based on molecular genetic

analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the 35S ribosomal RNA genes (35S rDNA). **Methods.** Polymerase chain reaction, cloning, sequencing, phylogenetic analysis. **Results.** The ITS1-5.8S-ITS2 region of the 35S rDNA of the K-27M strain was amplified with PCR using specific primers. Several clones were obtained, two of which were used for sequencing. The sequenced clones differed in length due to two deletions in one of them, as well as in nucleotide sequence. The presence of a deletion in the 18S rRNA gene region and numerous single nucleotide substitutions in the 18S and 5.8S rRNA gene regions in one of the clones may indicate that the 35S rRNA gene variant from which it was amplified is non-functional. Phylogenetic analysis using 26 sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region from 7 species of the genus *Rauvolfia* found in GenBank showed that the clones obtained from strain K-27M were grouped in a separate cluster together with other samples of *R. serpentina*. **Conclusions.** Based on molecular genetic analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the 35S rDNA, the tissue culture strain K-27M was found to belong to the species *R. serpentina*.

Keywords: *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz, plant tissue culture, molecular-genetic markers, 35S ribosomal RNA genes, internal transcribed spacer.