



УДК 582.998:575.858

Секвенирование и GO аннотация транскриптома культуры клеток и тканей *Rumex acetosa in vitro*

М. В. Скапцов, М. Г. Куцев, М. А. Краснобородкина, С. В. Смирнов, О. В. Уварова,
Т. А. Синицына, А. А. Кечайкин, А. И. Шмаков

Южно-Сибирский Ботанический сад, Алтайский государственный университет, ул. Лесосечная, 25,
Барнаул, 656906, Россия. E-mail: mr.skaptsov@mail.ru

Ключевые слова: кДНК, культура *in vitro*, РНК, транскриптом, *Rumex acetosa*.

Аннотация. В работе представлены данные секвенирования, *de novo* сборки и функциональная аннотация транскриптома каллусной культуры *Rumex acetosa*. Каллусную культуру поддерживали в течение двенадцати месяцев в присутствии бензиладенина и нафтилуксусной кислоты. Библиотеку кДНК готовили с использованием метода лигирования адаптеров по стандартному протоколу производителя секвенатора. В работе не использовали технику «shotgun», так как требовался только спектр экспрессируемых генов. Всего было получено 74067 прочтений с общим содержанием нуклеотидов 25110194 п.о. В результате сборки было получено 10169 контиг со средней длиной 339 п.о. На основе гомологии последовательностей из общего количества контиг в категории «биологические процессы» доминировали для транскриптома каллуса: «процессы клеточного метаболизма», «процессы метаболизма азота», «биосинтетические процессы» и «процессы метаболизма органических субстанций». В категории «молекулярные функции» доминировали: «трансферазная активность», «активность связывания гетероциклических соединений» и «активность связывания ионов». В категории «клеточный компонент» доминировали: «макромолекулярный комплекс», «органеллы», «клетка», «мембрана». По сравнению с контрольным транскриптомом полученный нами результат отличался сниженным разнообразием GO подкатегорий. Вариации в экспрессии групп генов могут являться доказательством эпигенетической изменчивости, выявленными нами в результате анализа транскриптома и GO аннотации. Пул мРНК менее разнообразен в каллусных линиях, что, видимо, связано со снижением специализации и дедифференцировкой клеток. Для пула мРНК культуры клеток *R. acetosa* было отмечено высокое содержание транскриптов ретроэлементов, таких как *Copia* и *Gypsy*. Подобные результаты свидетельствуют о возможном стрессовом ответе культур *in vitro* клеток и тканей *R. acetosa* и высокой изменчивости генома.

Sequencing and GO annotation of transcriptome of the cell and tissue *in vitro* culture of *Rumex acetosa*

M. V. Skaptsov, M. G. Kutsev, M. A. Krasnoborodkina, S. V. Smirnov, O. V. Uvarova,
T. A. Sinitsyna, A. A. Kechaykin, A. I. Shmakov

South Siberian Botanical Garden, Altai State University, Lesosechnaya st., 25, Barnaul, 656906, Russia

Key words: cDNA, culture *in vitro*, RNA, *Rumex acetosa*, transcriptome.

Summary. The paper presents sequencing data, *de novo* assemblies and a functional annotation of transcriptome of the callus culture of *Rumex acetosa* L. The callus culture was maintained for twelve months in the presence of benzyladenine and naphthylacetic acid. The cDNA library was prepared using the adapter ligation method according to the standard protocol of the sequencer manufacturer. In the work, the “shotgun” technique was not used, since only the spectrum of the expression genes was required. In total it was obtained 74067 reads with a total 25,110,194 bp

nucleotides. 10169 contigs were obtained in the resulting assembly with a medium length of 339 bp. Based on the sequence homology of total contigs in the category of biological processes for transcriptome callus, “cell metabolism”, “nitrogen metabolism”, “biosynthetic processes” and “metabolic processes of organic substances” dominated. In the category of molecular function, “transferase activity”, “heterocyclic compounds binding activity” and “binding the ions” dominated. In the category of the cellular component, the “macromolecular complex”, “organelles”, “cell”, “membrane” dominated. In comparison with the control transcriptome, the result obtained by us was distinguished by a reduced variety of GO subcategories. Variations in the expression of gene groups may proof epigenetic variation, which we have identified by GO annotations and transcriptome analysis. The mRNA pool is less diverse in callus lines, which, apparently, is associated with reduced specialization and dedifferentiation of cells. For the mRNA pool of *R. acetosa* cell culture, a high content of transcripts of retroelements, such as *Copia* and *Gypsy*, was noted. Similar results indicate a possible stress response of *in vitro* culture of cells and tissues of *R. acetosa* and high genome variability.

Введение

Культуру клеток и тканей растений *in vitro* используют во всем мире для микроразмножения, сохранения биоразнообразия, исследования изменения генома изолированных клеток, генной инженерии уже многие десятки лет. Благодаря явлению тотипотентности растений возможно вызвать дедифференцировку клеток и под воздействием регуляторов роста индуцировать регенерацию. Возможность получения тысяч особей растений из небольшого фрагмента ткани является привлекательной для сохранения редких, исчезающих и эндемичных видов растений. В сохранении генофонда растений более всего нуждаются редкие и исчезающие виды, эндемики и растения, имеющие большое хозяйственное значение. В настоящее время число видов, находящихся под угрозой исчезновения, постоянно увеличивается из-за климатических изменений и активной хозяйственной деятельности человека. На основе методов культуры *in vitro* разрабатываются технологии сохранения биоразнообразия различных растительных объектов в сохраняемых коллекциях клеток, тканей, изолированных органов и микрочнонально размножаемых растений. Коллекции поддерживаются путем субкультивирования в пересадочной культуре. Подобные подходы трудозатратны и требуют тщательного поддержания условий культивирования во избежание изменчивости. Эпигенетическая изменчивость зачастую не приводит к изменению фенотипических признаков, тогда как генетические полиморфизмы могут повлиять на фенотип даже через несколько поколений при половом размножении. Для многих видов генетическая стабильность подтверждена молекулярно-генетическими методами. Так, для *Hedysarum theinum* Krasnob. показана стабильность регенерантов на протяжении пяти пассажей и их идентичность материнскому растению (Erst et al., 2015). Однако подобные примеры

являются скорее исключением, и мутагенез *in vitro* проявляется на различных уровнях организации генома (Hofmann et al., 2004; Machczyńska et al., 2015). Различные способы и стадии культивирования также могут оказывать разное воздействие на полиморфизм ДНК. Например, для *Fragaria vesca* L. в результате криосохранения тканей апекса показано, что у посткриогенных регенерантов появление морфологически измененных форм растений не было отмечено, тогда как варибельность ДНК-маркеров снижалась в два раза, независимо от продолжительности дегидратации (Solov'eva et al., 2016). В то же время, по данным Бутенко (Butenko, 1999), различные виды растений в коллекции проходят своеобразную эволюцию по типу конвергенции и дивергенции. Существует множество подходов к уменьшению скорости подобной «эволюции» *in vitro* – низкие температуры, гипоксия, использование осмотиков и веществ, тормозящих рост и развитие растений.

Изменчивость соматклонов в результате культивирования *in vitro* доходит до 40 % уже после 3–4 пассажей и зависит от характера используемых фитогормонов (Khan et al., 2008). Отмечены изменения генотипа при изменении состава питательной среды и условий выращивания, в частности, при переходе от поверхностного выращивания каллусной ткани к глубинному (Spiridonova et al., 2007). Исследования динамики изменений генома культур клеток и тканей, а также поиск способов снижения данных изменений необходимы как для лекарственных растений, культивируемых на данный момент, так и для заново вводимых в культуру *in vitro*. Ставится под сомнение сохранение редких и исчезающих растений с помощью методов биотехнологии, широко используемых при реализации программ по сохранению биоразнообразия и генетических ресурсов, так как отсутствует универсальный подход по культивированию *in*

in vitro из-за возможных генетических перестроек, кардинально меняющих структуру генома и отражающихся на анатомо-морфологических признаках. Между тем, методы биотехнологии растений широко используются как в промышленности, так и в лабораториях по всему миру без анализа генетических изменений. Целью настоящей работы является секвенирование и аннотация транскриптома каллусной культуры *Rumex acetosa* L. после двенадцати месяцев культивирования.

Материалы и методы

Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями (Butenko, 1999). На различных этапах экспериментальной работы использовали минеральную основу питательных сред Мурасиге-Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы и 0,3 % фитагеля (Murashige, 1962; Muratova et al., 2010). Существенным моментом, обеспечивающим длительное поддержание активно пролиферирующей культуры *in vitro*, является выбор питательной среды и оптимальное соотношение регуляторов роста. Как показали результаты наших исследований, темпы роста каллуса *R. acetosa* максимальны при концентрациях 1 мг/л бензиладенина и 2 мг/л нафтилукусусной кислоты.

РНК выделяли из образцов *R. acetosa* со стадии культивирования каллуса 12 месяцев. Для выделения РНК использовали следующий протокол. 50–100 мг растительного материала измельчали с помощью пластикового пестика в пробирке Эппендорф 1,5 мл. Добавляли 10 мкл папаина, 10 мкл меркаптоэтанола. Добавляли 700 мкл буфера для денатурации (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ Трилон Б, 4 М Гуанидин тиоционат. рН 4,3). Встряхивали на вортексе. Сразу добавляли 300 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (92/8). Встряхивали до состояния эмульсии. Центрифугировали (ЦФ) 1 минуту при 13000 g. Супернатант переносили в новую пробирку. Добавляли равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт. Центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах. Супернатант переносили в новую пробирку. Добавляли равный объем холодного изопропанола. ЦФ 10 минут на максимальных оборотах. Изопропанол сливали. Осадок промывали в 70 % этаноле. ЦФ 30 секунд. Остаток спирта удаляли пипеткой. Осадок растворяли в 250 мкл ТЕ-буфера. Добавляли 250 мкл раствора для преципитации (6 М хлорид ли-

тия). Переносили на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 мин ЦФ 10–20 мин на максимальных оборотах. Супернатант удаляли пипеткой. Осадок ополаскивали в 70 % этаноле. Этанол удаляли. Осадок подсушивали на воздухе 10 мин. Растворяли в 20–50 мкл воды. К препарату РНК (2 мкг) добавляли 20 ед. ингибитора РНКаз и 10 ед. ДНКазы. Инкубировали 30 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Инактивировали фермент при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин. Ставили реакцию обратной транскрипции с поли-dT-олигонуклеотидом.

Для синтеза второй цепи кДНК в смесь для обратной транскрипции добавляли 0,2 мкг Random-гексануклеотида и 5 ед. фрагмента Кленова. Инкубировали в амплификаторе в течение 2 часов при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Двухцепочечную кДНК очищали с использованием магнитных частиц КлинМаг (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

Библиотеку кДНК готовили с использованием набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kits (Roche 454, Branford, CT). Эмульсионную ПЦР и пиросеквенирование подготавливали с использованием наборов Roche454 и осуществляли согласно инструкции производителя. Реакцию секвенирования производили на секвенаторе Roche 454 GSJunior. *De novo* сборку, нормализацию, поиск ошибок и дублированных последовательностей осуществляли с использованием ПО Geneious, Biomatters Limited с покрытием не менее 40. Выявление кодирующих последовательностей ДНК осуществляли с использованием сервиса Augustus с использованием стандартных настроек. В качестве стандартного организма использовали *Solanum lycopersicum* (Stanke, Morgenstern, 2005). Поиск гомологичных последовательностей по алгоритмам BLAST и GO (gene ontology) анализ для функциональной аннотации осуществляли с использованием ПО Blast2GO со значением e-value не менее 1×10^{-3} .

Результаты и обсуждение

В результате работы была подготовлена библиотека кДНК каллуса 12-ти месяцев культивирования, полученная после обогащения мРНК с поли-dT олигонуклеотидом в результате обратной транскрипции тотальной РНК *R. acetosa*. Всего было получено 74067 прочтений с общим содержанием нуклеотидов 25110194 п.о. Средняя длина прочтений составила 339 п.о. После *de novo* сборки было получено 10169 контигов с минимальной длиной 40 п.о., максимальной – 7749 п.о. После поиска кодирующих последо-

вательностей ДНК было получено 3888 аминокислотных последовательностей. Для сравнения использовали массив данных секвенирования кДНК листьев *R. acetosa*, депонированной в базе данных NCBI SRA № ERX190909. После *de novo* сборки было получено 7803 контиги с минимальной длиной 252 п.о., максимальной – 7063 п.о. После поиска кодирующих последовательностей ДНК было получено 4873 аминокислотных последовательностей. Всего получено более 7000 аннотаций. Большая часть аннотаций была получена в базе данных UniProtDB, оставшаяся часть составили TAIR, GR Protein и PDB. GO аннотация – международная система классификации для стандартизации функций генов, которая включает три GO категории: биологические процессы, молекулярные функции и клеточный компонент. На основе гомологии последовательностей из общего количества контиг в категории «биологические процессы» доминировали для транскриптома каллуса: «процессы клеточного метаболизма», «процессы метаболизма азота», «биосинтетические процессы» и «процессы метаболизма органических субстанций». В категории «молекулярные функции» доминировали: «трансферазная активность», «активность связывания гетероциклических соединений» и «активность связывания ионов». В категории «клеточный компонент» доминировали: «макромолекулярный комплекс», «органеллы», «клетка», «мембрана» (рис. 1).

Для транскриптома листьев *R. acetosa* в категории «биологические процессы» доминировали: «процессы клеточного метаболизма», «регулирование биологических процессов», «организации клеточного компонента», «биосинтетические процессы» и «процессы метаболизма органических субстанций». В категории молекулярные функции доминировали: «трансферазная активность», «гидролазная активность», «оксиредуктазная активность», «активность связывания гетероциклических соединений» и «связывания ионов». В категории клеточный компонент доминировали: «макромолекулярный комплекс», «органеллы», «клетка», «мембрана» (рис. 2).

Вариации в экспрессии групп генов могут являться доказательством эпигенетической изменчивости, выявленным нами в результате анализа транскриптома и GO аннотации. Пул мРНК менее разнообразен в каллусных линиях, что,

видимо, связано со снижением специализации и дедифференцировкой клеток. Что касается исследований других авторов, то в некоторых работах отмечено резкое увеличение транскрипционной активности стрессовых ответов на стадии соматического эмбриогенеза или генов, участвующих в передаче сигнала растительных гормонов и метаболизма сахарозы в эмбрионных каллусах (Jin et al., 2014; Li et al., 2014). Для пула мРНК культуры клеток *R. acetosa* было отмечено высокое содержание транскриптов ретроэлементов, таких как *Copia* и *Gypsy*. Таким образом, культуры тканей могут активировать некоторые мобильные генетические элементы, тогда как другие остаются неповрежденными или их уровень активности изменяется. В некоторых работах предполагается, что последующее половое размножение регенерантов стабилизирует активность ретротранспозонов (Orłowska et al., 2016). Тем не менее, частота транспозиции может быть различной у разных типов ретротранспозонов. Подобные явления установлены в различных работах для *Gypsy*, *Copia* и LINE транспозонов (Wessler, 1996; Evrensel et al., 2011; Temel, Gozukirmiz, 2013). Например, уровни транспозиции BARE1 ретротранспозона (*Copia*) не различаются у соматических клонов. Следовательно, вариации геномов клеток каллусов посредством движения ретротранспозонов могут способствовать диверсификации генотипа и фенотипа растений (Yilmaz, Gozukirmizi, 2013). Как известно, изменчивость в частоте транспозиции может внести значительный вклад в генотип растения и приводить к фенотипическим изменениям. Ранее выявлено, что цвет семян и цветков *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *Brassica rapa* L., изменения междоузлий *Oryza sativa* L. и цвета плодов *Vitis vinifera* L. опосредованы вставками ретроэлементов (Clegg, Durbin, 2000; Kobayashi et al., 2004; Park et al., 2007). Тем самым, детекция изменчивости в профиле мРНК позволяет проводить скрининговые исследования для объяснения влияния факторов среды на полиморфизм генома растений и упростить валидацию методик для объяснения тех или иных явлений.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-34-00313) и МинОбрНауки РФ (проект № 6.5498.2017/8.9).

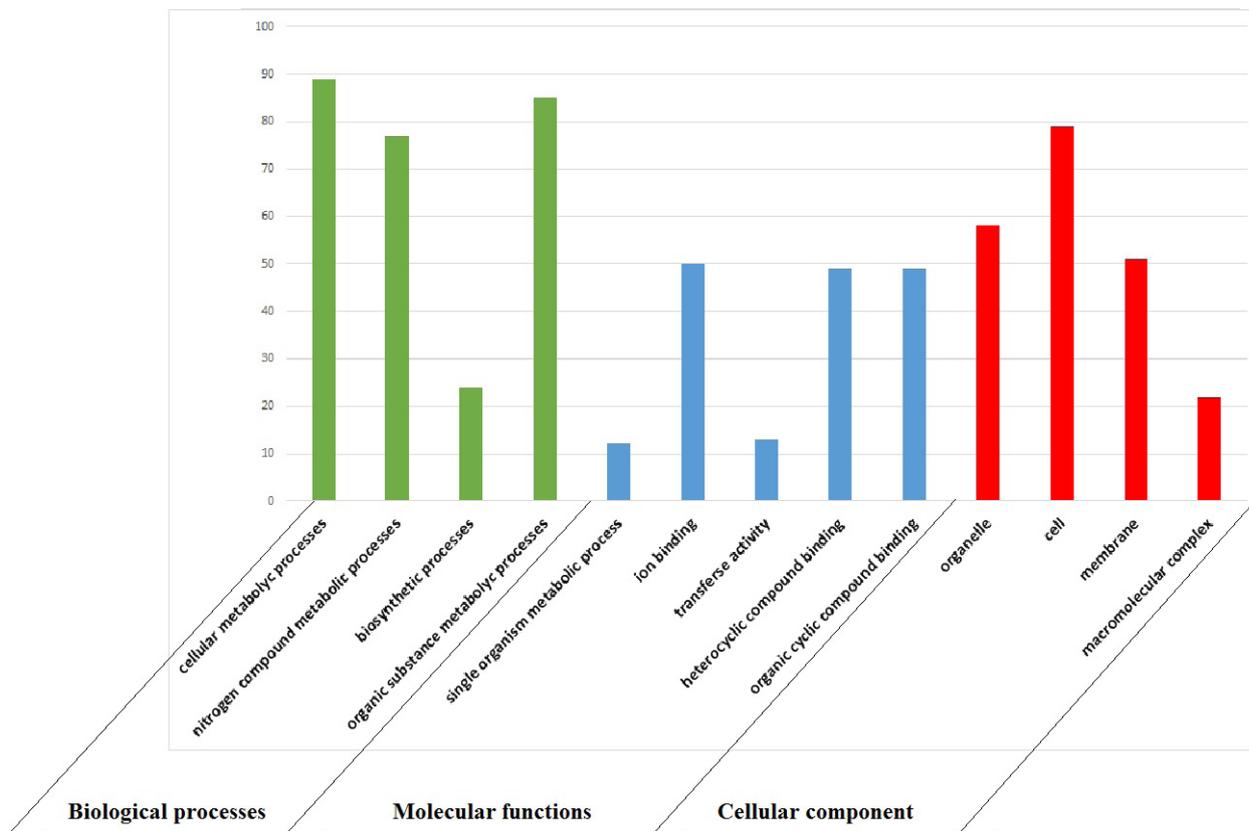


Рис. 1. GO аннотация основных групп генов для каллуса *Rumex acetosa*, полученного в данном исследовании (GO подкатегории второго уровня).

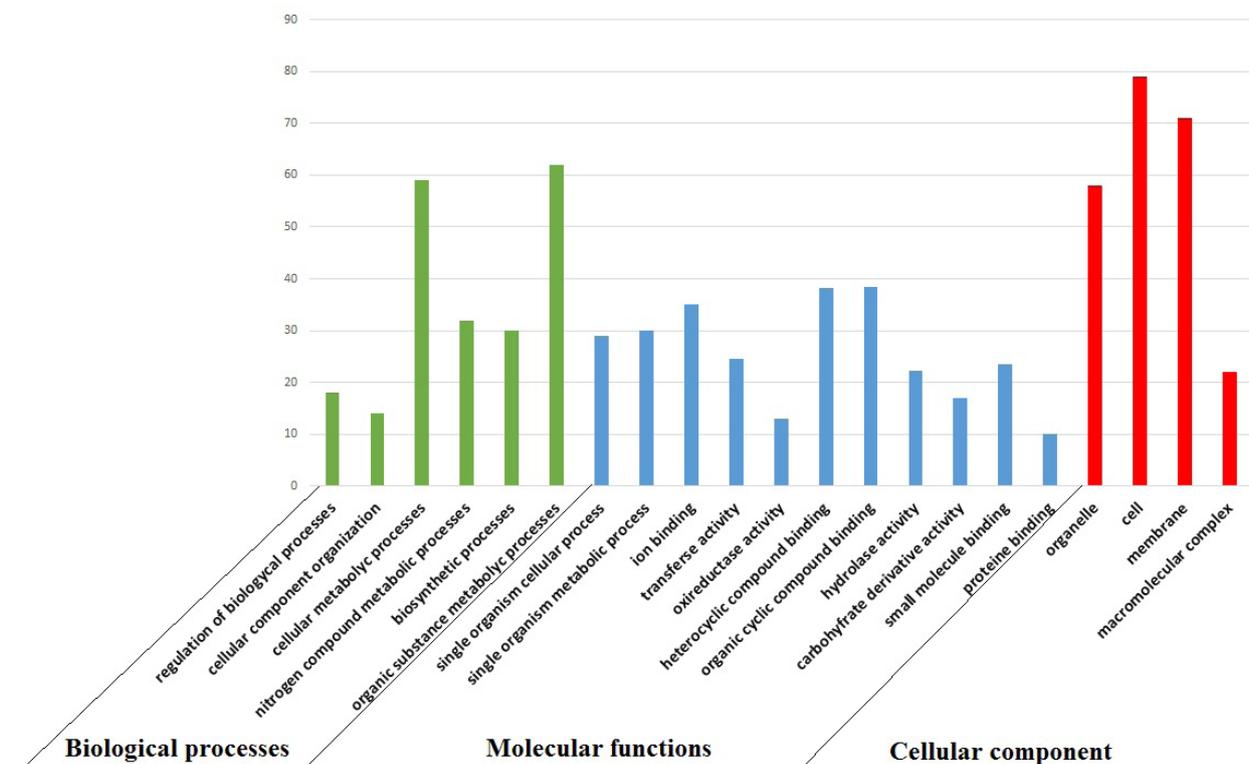


Рис. 2. GO аннотация основных групп генов для листьев *Rumex acetosa*, на основе данных NCBI SRA № ERX190909 (GO подкатегории второго уровня).

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Butenko R. G.** 1999. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologii na ikh osnove [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]*. FBK-Press, Moscow, 160 pp. [In Russian]. (**Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.).
- Clegg M. T., Durbin M. L.** 2000. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7016–7023. DOI: 10.1073/pnas.97.13.7016
- Erst A. A., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V.** 2015. Clonal micropropagation of a rare species *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) and assessment of the genetic stability of regenerated plants using ISSR markers. *Russ. J. Genet.* 51: 158–162. DOI: 10.1134/S1022795415020076.
- Evrensel C., Yilmaz S., Temel A., Gozukirmizi N.** 2011. Variations in BARE – 1 insertion patterns in barley callus cultures. *Genet. Mol. Res.* 10, 2: 980–987. DOI: 10.4238/vol10-2gmr965
- Hofmann N. E., Raja R., Nelson R. L., Korban S.** 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biol. Plant.* 48, 2: 173–177. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000033441.46242.94.
- Jin F., Hu L., Yuan D., Xu J., Gao W., He L., Yang X., Zhang X.** 2014. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol. J.* 12: 161–173. DOI: 10.1111/pbi.12123.
- Khan I. A., Dahot M. U., Bibi N. S. S., Khatri A.** 2008. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane. *Pak. J. Bot.* 40: 554–564.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H.** 2004. Retrotransposon – induced mutations in grape skin color. *Science* 304: 982. DOI: 10.1126/science.1095011
- Li Q., Zhang S., Wang J.** 2014. Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana*. *BMC Genomics* 15: 553. DOI: 10.1186/1471-2164-15-553
- Machczyńska J., Zimny J., Bednarek P. T.** 2015. Tissue culture – induced genetic and epigenetic variation in triticale (\times Triticosecale sP. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol. Biol.* 89, 3: 279–292. DOI: 10.1007/s11103-015-0368-0
- Orłowska R., Machczyńska J., Oleszczuk S., Zimny J., Bednarek P. T.** 2016. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Biol. Res. (Thessalon)* 23: 19. DOI: 10.1186/s40709-016-0056-5
- Park K. I., Ishikawa N., Morita Y., Choi J. D., Hoshino A., Iida S.** 2007. A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *Plant J.* 49, 4: 641–654. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02988.x
- Solov'eva A. I., Vysotskaya O. N., Dolgikh Yu. I.** 2016. Effect of dehydration duration of apices on characteristics of in vitro plants of *Fragaria vesca* after cryopreservation. *Russ. J. Plant Physiol.* 63: 243–251. DOI: 10.1134/S1021443716020138
- Spiridonova E. V., Adnafi D. M., Andreev O., Kunakh V. A.** 2007. Dynamics of changes in the genome of callus tissues of *Rauwolfia serpentina* upon a switch to conditions of submerged cultivation. *Cytol. Genet.* 42, 2: 101–106. DOI: 10.1007/s11956-008-2006-0
- Stanke M., Morgenstern B.** 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res.* 33: 465–467. DOI: 10.1093/nar/gki458
- Temel A., Gozukirmizi N.** 2013. Analysis of retrotransposition and DNA methylation in barley callus culture. *Acta Biol. Hung.* 64, 1: 86–95. DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.1.8
- Wessler S. R.** 1996. Turned on by stress. Plant retrotransposons. *Curr. Biol.* 6, 8: 959–961.
- Yilmaz S., Gozukirmizi N.** 2013. Variation of retrotransposon movement in callus culture and regenerated shoots of barley. *Biotech. Biotechnol. Equip.* 27, 6: 4227–4230. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0076