

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАРА-ФТОРФЕНИЛАЛАНИН-УСТОЙЧИВОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МАКРОТОМИИ КРАСЯЩЕЙ

*Устойчивая к пара-фторфенилаланину (ФФА) клеточная культура макротомии красящей (*Agavebia/Macrotomia eichroma* (Royle) Pauls) характеризуется пониженным уровнем накопления нафтохинонов по сравнению с исходным клеточным штаммом и сохраняет эту особенность в течение длительного выращивания в отсутствие селективного фактора. Наблюдается возрастание ее устойчивости к ФФА. Присутствие в среде индолилмасляной кислоты вместо индолилуксусной и кинетина стимулирует биосинтез нафтохинонов в клетках ФФА-устойчивого варианта. Корнеобразование, происходящее при таком условии в контрольной культуре, у ФФА-устойчивого варианта не проявляется.*

Введение. Пара-фторфенилаланин (ФФА) и его биологические эффекты привлекают внимание специалистов разного профиля. Изучение действия ФФА на цитологическом уровне, в частности выявление его способности вызывать гаплоидизацию клеток у грибов [1], привело к появлению ряда работ цитогенетического характера. Этими исследованиями показано, что результатом действия ФФА могут быть различные изменения хромосомных чисел в клетках интактных растений [2], у культивируемых *in vitro* клеток и получаемых из них растений-регенерантов [3, 4]. В основе подобных изменений лежит способность ФФА приводить к структурным модификациям веретена деления клеток, что было выявлено у клеток как животного [5], так и растительного [6] происхождения. ФФА рассматривается как специфический индуктор анеуплоидии у растений [2]. Обнаружен также ряд физиологических эффектов ФФА. Как антиметаболит, вызывающий нарушения на уровне биосинтеза и/или функционирования белков, он оказывает ингибирующее влияние на рост растений [7]. Вместе с тем известно, что в довольно широком диапазоне концентраций он стимулирует удлинение coleoptилей овса, угнетая при этом фенилаланин-зависимый синтез фенольных ингибиторов роста [8]. В условиях *in vitro* ФФА способствует корнеобразованию в первичном каллусе табака, а у устойчивых к его повышенным дозам каллусных тканей табака и мака — стимулирует эмбриогенез [9]. Получение устойчивых к повышенным дозам ФФА линий культивируемых клеток многих видов растений выявило характерные изменения метаболизма клеток, проявляющиеся, прежде всего, в виде суперпродукции свободного фенилаланина или увеличения содержания фенольных соединений [10]. Последнее обстоятельство представляет особый интерес в связи с возможностью использования ФФА в качестве индуктора направленных изменений вторичного метаболизма культивируемых клеток растений, что, в свою очередь, важно для создания биотехнологий получения практически ценных продуктов вторичного обмена. Есть результаты, подтверждающие эту возможность. Показано, например, что устойчивость к ФФА сочетается с усиленным накоплением капсаицина в культивируемых клетках *Capsicum annuum* [11] и розмариновой кис-

лоты — в клетках *Anchuza officinalis* [12]. С подобной целью нами была получена устойчивая к ФФА клеточная культура макротомии красящей, являющейся продуцентом красного нафтохинонового пигмента шиконина, известного как натуральный краситель и как лекарственное средство. Предполагалось, что в случае суперпродукции и дальнейшей метаболизации свободного фенилаланина можно будет наблюдать увеличение накопления нафтохинонов. Однако полученный ФФА-устойчивый вариант клеточной культуры макротомии характеризовался пониженной продуктивностью по накоплению как биомассы, так и шиконина [13]. В настоящей работе приведены результаты последующего изучения особенностей данного варианта культуры в сравнении с исходным клеточным штаммом, что представляет интерес для выяснения природы ФФА-устойчивости у изучаемого объекта.

Материалы и методы. В качестве контроля использовали штамм суспензионной культуры макротомии красящей АЕ80-2 (*Arnebia/Macrotonia euchroma* (Royle) Pauls, сем. *Voraginaceae*), полученный нами с помощью двукратной процедуры клонирования мелких клеточных агрегатов. Материалом для клонирования служила суспензионная культура (штамм 80) производства ПО «ВИЛР» (Москва) [14]. Клеточную суспензию штамма АЕ80-2 выращивали в среде Мурасиге — Скуга с модификациями по [14] в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды, на качалке (60—80 об/мин) при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$ без освещения. Интервал пересадок культуры 14 сут.

ФФА-устойчивый вариант культуры, полученный ступенчатой селекцией клосток штамма АЕ80-2 [13], выращивали в среде с аналогом в концентрации 100 мг/мл и в контрольной среде.

Содержание нафтохинонов в образцах клеточной суспензии определяли по содержанию шиконина. Для этого клеточную суспензию экстрагировали подкисленным спиртом (1 мл конц. H_2SO_4 /1 л EtOH) при подогреве до 60°C . Из спиртовых экстрактов нафтохиноны извлекали жидким парафином, а из парафиновых — 5 %-м раствором КОН, в котором все нафтохиноны (ацильные производные шиконина) гидролизуются с образованием шиконина. Щелочные растворы измеряли фотокolorиметрически.

Для активации корнеобразования у контрольного штамма в среду вместо индолилуксусной кислоты (ИУК) и кинетина вносили индолилмасляную кислоту (ИМК) в количестве 0,3—1,0 мг/л. На такую же среду переносили ФФА-устойчивый вариант культуры после выращивания его в среде, содержащей 100 мг/л ФФА.

В работе использовали ФФА, синтезированный в Ин-те молекуляр. биологии и генетики АН Украины. ФФА вносили в питательную среду до автоклавирования.

Опыты осуществляли в 3—5-кратной повторности.

Результаты и обсуждение. Для выявления различий у ФФА-устойчивой суспензионной культуры макротомии и исходного клеточного штамма изучали их реакцию на воздействие ИМК, оценивая при этом продуктивность клеток и их способность к корнеобразованию, а также проверяли дозовую зависимость роста и накопления нафтохинонов в присутствии ФФА у обоих вариантов культуры после длительного их выращивания в контрольной среде.

На примере культивируемых клеток воробейника — одного из продуцентов шиконина было установлено, что синтетические ауксины (2,4-Д и α -НУК) угнетают биосинтез нафтохинонов, тогда как природный ауксин (ИУК) способствует лучшему их накоплению и одновременно лучшему росту культуры [15]. ИМК относится к группе синтетических ауксинов, однако, как показали результаты настоящего исследования, она не угнетает процесс биосинтеза нафтохинонов в культуре клеток макротомии. Перенос клеток контрольного штамма и его ФФА-устойчивого варианта, выращиваемого в течение 15 пассажей в присутствии ФФА, на контрольную среду, в которой ИУК и кинетин заменены на ИМК, выявил у них одинаковое по направленности изме-

нение продуктивности клеток (рис. 1, варианты K_1 и Φ_1). Реакция контрольного штамма при этом оказалась значительно слабее, чем устойчивого варианта, продуктивность которого повышалась в 6 раз по сравнению с уровнем, наблюдаемым у него на среде с ФФА. Однако восстановление биосинтетической активности ФФА-устойчивых клеток было лишь частичным по отношению к контрольному штамму и составило 56,5 % от его уровня. Кроме того, отмеченная стимуляция биосинтеза нафтохинонов оказалась зависимой от присутствия ИМК. Возврат

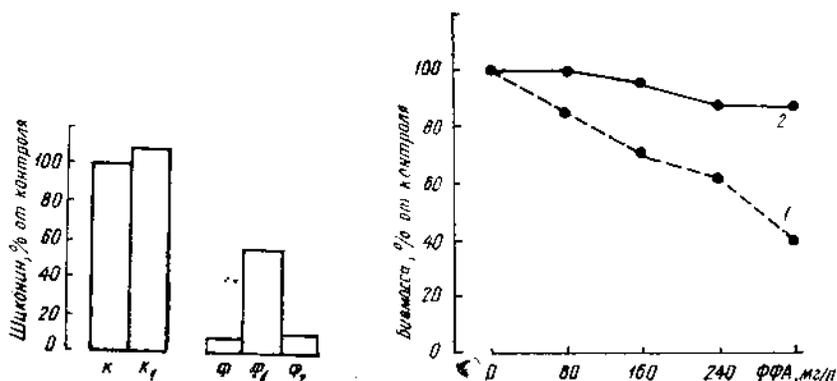


Рис. 1. Содержание шиконина в клеточной суспензии исходного штамма макротомии (K — контрольная среда; K_1 — среда с ИМК) и ФФА-устойчивого варианта (Φ — контрольная среда, содержащая 100 мг/л ФФА; Φ_1 — среда с ИМК; Φ_2 — контрольная среда после среды с ИМК). Приведенные значения представляют усредненные за 3—5 пассажей данные. В каждом пассаже анализировали по 3—5 субкультур

Рис. 2. Дозовая зависимость роста контрольной (1) и устойчивой к ФФА (2) клеточных культур макротомии через 14 сут выращивания на средах с ФФА. Размер инокулята для (1) — 28 %, для (2) — 32 % от конечного прироста (соответственно 0,27 и 0,23 мг сухой массы на 25 мл среды)

ФФА-устойчивого варианта со среды с ИМК на контрольную среду, содержащую или не содержащую ФФА, сразу приводил к снижению содержания шиконина до характерного для этого варианта уровня, составляющего в среднем 8 % от уровня контрольного штамма (рис. 1, вариант Φ_2). При последующем выращивании ФФА-устойчивого варианта на контрольной среде в течение 29 пассажей постепенно происходило некоторое усиление накопления нафтохинонов, однако их уровень в среднем не превышал 25,2 % от уровня контроля.

Для проверки устойчивости после длительного выращивания (в течение 1,5 лет) в среде без селективного фактора ФФА-устойчивый вариант культуры перенесли на среды, содержащие от 80 до 320 мг/л ФФА (рис. 2). Как видно из рисунка, ФФА-устойчивый вариант сохранил устойчивость к данному антималярийному и, кроме того, обнаружил устойчивость к более высоким дозам ФФА по сравнению с той (100 мг/л), при которой он был отселектирован. Последующая проверка показала, что этот вариант способен нормально расти при концентрации ФФА 320 мг/л. Подобное изменение степени устойчивости было отмечено в случае ФФА-устойчивой клеточной линии табака, полученной при установленной для нее ранее летальной дозе ФФА 18 мг/л, а спустя несколько лет эта линия обнаружила нормальный рост при концентрации аналога 120 мг/л [16].

Из анализа кривых дозовой зависимости роста исследуемых вариантов культуры макротомии следует также, что повышение уровня устойчивости к ФФА проявилось не только у ФФА-устойчивого варианта, но и у чувствительного к нему контрольного штамма. Следует отметить, что за прошедший период этот штамм подвергался постоянному отбору наиболее продуктивных по накоплению шиконина субкультур и периодическому отбору фракций мелких клеточных агрегатов суспензии. Это привело к значительному повышению продуктивности культуры. Про-

изошедшие при этом изменения вторичного метаболизма клеток могли способствовать повышению их устойчивости к стрессовым воздействиям. Снижение чувствительности по мере роста клеток в условиях *in vitro* было обнаружено для контрольной клеточной линии табака в цитируемой выше работе [16]. При попытке повторного получения от этой линии устойчивого к ФФА варианта оказалось, что летальной для нее была доза, в 3 раза превышающая ранее установленную. Не выявив у чувствительной линии изменений по таким параметрам, как уровень накопления фенольных соединений, активность ФАЛ-

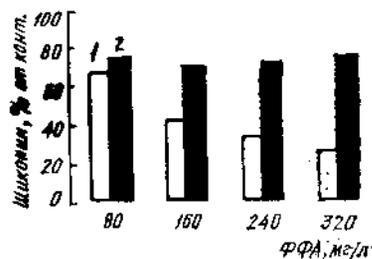


Рис. 3. Содержание шиконина в контрольной (1) и устойчивой к ФФА (2) клеточных культурах макротомии через 14 сут роста на среде с ФФА

лиазы, а также активность поступления ФФА в клетки, авторы пришли к выводу о том, что изменение чувствительности клеток могло быть обусловлено условиями культивирования, в частности, плотностью подвергаемой обработке клеточной популяции, так как использованные ими инокуляты ткани по массе более чем в 2 раза превышали исходные.

Результаты изучения зависимости накопления нафтохинонов от содержания ФФА в среде у контрольного штамма, а также у ФФА-устойчивого варианта после 1,5 лет его выращивания в среде без селективного фактора представлены на рис. 3. У контрольного штамма по мере возрастания концентрации ФФА наряду с угнетением роста клеток (см. рис. 2) наблюдали снижение уровня накопления нафтохинонов, что согласуется с полученными ранее данными [13]. В случае ФФА-устойчивого варианта уровень накопления нафтохинонов тоже снижался, но это снижение не превышало 30 % при всех использованных концентрациях ФФА.

Одной из особенностей роста контрольного штамма культуры макротомии является отсутствие видимых признаков морфогенеза на контрольной среде. При замене в среде ИУК и кинетина на ИМК у него начинается обильное корнеобразование. Перенос ФФА-устойчивого варианта через 15 пассажей роста в среде, содержащей 100 мг/л ФФА, на среду с указанным выше изменением гормонального состава показал, что этот вариант утратил способность к корнеобразованию при данных условиях. Осталось неясным, произошла ли потеря этой способности сразу с приобретением клетками устойчивости к аналогу или позже. В работах [9, 17] на примере ФФА-устойчивых клеточных культур табака показано, что их способность к регенерации растений проявляется в течение 7—9 месяцев с момента получения этих линий, а затем утрачивается. В отличие от подавления корнеобразования, наблюдаемого в ФФА-устойчивой культуре макротомии, первичное воздействие ФФА на эксплантаты листьев табака способствовало тому, что появление первичного каллуса сопровождалось интенсивным корнеобразованием [9]. Однако и этот процесс был ограничен во времени, так как при дальнейшем пассировании каллуса на средах с ФФА корнеобразование прекратилось. Изменение со временем характера вызываемых ФФА физиологических эффектов зависит не только от длительности воздействия аналогом, но и от его концентрации. Отмечено в работе [9] корнеобразование у первичного каллуса табака наблюдали при 20—60 мг/л ФФА, тогда как у устойчивых к 80—100 мг/л ФФА каллусов проявлялась в индуцирующих условиях иная морфогенная реакция — эмбриогенез и регенерация растений.

Приведенные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что устойчивость к повышенным дозам ФФА и низкая по сравнению с исходным штаммом продуктивность ФФА-устойчивого варианта суспензионной клеточной культуры макротомии сохраняются независи-

мо от присутствия антиметаболита в среде и в течение длительного времени. Тем не менее, снижение продуктивности данного варианта культуры, по-видимому, обусловлено частично обратимыми метаболическими превращениями в клетках, так как содержание нафтохинонов значительно повышается в присутствии ауксина ИМК, используемого в физиологических дозах. Сохранение способности расти при высоких дозах ФФА является характерной чертой ФФА-устойчивых клеточных линий растений. В ряде случаев такие линии расцениваются как мутантные. Предложено использовать признак ФФА-устойчивости как генетический маркер [17]. Однако мутационная природа ФФА-устойчивости культивируемых клеток растений на сегодня не является доказанной [16], и вопрос о природе устойчивости к данному антиметаболиту остается дискуссионным.

О. В. Захленюк

ДЕЯКІ ОСОБЛИВОСТІ ПАРА-ФТОРФЕНІЛАЛАНІН-СТІЙКОЇ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ МАКРОТОМІЇ БАРВЛЯЧОЇ

Резюме

Стойка до пара-фторфенілаланіну (ФФА) суспензійна клітинна культура макротомії барвлячої (*Arnebija/Macrotomia euchroma* (Royle) Pauls) характеризується зниженням рівнем накопичення шиконіну в порівнянні з вихідним клітинним штамом і зберігає цю особливість протягом тривалого вирощування у відсутності селективного фактора. Водночас спостерігається зростання стійкості до ФФА. Присутність у середовищі індолілмасляної кислоти замість індолілоцтової та кінетину призводить до часткового відновлення продуктивності клітин ФФА-стійкого варіанту. Коренеутворення, що відбувається за такої умови в контрольній культурі, у ФФА-стійкого варіанту не виявлено.

О. В. Zakhlenjuk

SOME PECULIARITIES OF PARA-FLUOROPHENYLALANINE RESISTANT MACROTOMIA DYEING CELL CULTURE

Summary

Suspension culture of macrotomia dyeing (*Arnebija/Macrotomia euchroma* (Royle) Pauls) resistant to para-fluorophenylalanine (PFP) is characterized by low level of shikonin accumulation as compared to initial cell strain and retain this feature for a long time of growth in the absence of PFP. At the same time increase of resistance level is observed. Indolebutyric acid instead of indoleacetic acid and kinetin promote partial recovery of cell productivity. No rootformation usually observed in initial cell strain after such phytohormone exchange in medium is observed in PFP-resistant variant.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lhoas P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *p*-fluorophenylalanine // Nature.— 1961.— 190, № 4777.— P. 744.
2. Banks P., Britten E. J., Gordon G. H. Para-fluorophenylalanine-induced chromosome number changes in higher plants. I. Maize // Genome.— 1989.— 32.— P. 962—966.
3. Nüzeki M. Studies on plant cell and tissue culture. IV. Effect of para-fluorophenylalanine on haploid and diploid cells of tobacco plant *in vitro* // J. Faculty Agric. Hokkaido Univ.— 1974.— 57, № 4.— P. 349—356.
4. Fukui K., Nüzeki H. Artificial reduction of chromosome number in *Fragaria nanasa* following treatment with *p*-fluorophenylalanine // Plant Tissue Culture: Proc. 5 Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture (Tokyo and Lake Jamanaka, 1982).— Tokyo, 1982.— P. 427—428.
5. Siskin J. E. The effects of *p*-D,L-fluorophenylalanine on chromosome movement and cytokinesis of human amnion cells in culture // Chromosoma.— 1973.— 44.— P. 91—98.
6. Левенко Б. А., Кифорак О. В. Влияние фторфенилаланина на культуру тканей томата и гаплопепуса // Эксперим. генетика растений.— Киев: Наук. думка, 1977.— С. 138—142.
7. Nooden L. D., Thimann K. V. Action of inhibitors of RNA and protein synthesis on cell enlargement // Plant Physiol.— 1966.— 41.— P. 157—164.

8. Orkiszewski J. A. J., Hopkins W. G. Effect of fluorophenylalanine on L-phenylalanine ammonialyase activity in *Avena coleoptiles* // Amer. J. Bot.—1974.— 61, N 4.— P. 433—436.
9. Захленюк О. В., Костенюк И. А. Некоторые цито- и морфогенетические эффекты пара-фторфенилаланина в культуре тканей *Nicotiana tabacum* и *Paraver bracteatum* // Биополимеры и клетка — 1991.— 7, № 5.— С. 66—71.
10. Berlin J., Widholm J. Correlation between phenylalanine ammonialyase activity and phenolic biosynthesis in *p*-fluorophenylalanine sensitive and resistant tobacco and carrot cell cultures // Plant Physiol.—1977.— 59.— P. 550—553.
11. Salgado-Garciglia R., Ochoa-Alejo N. Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) // Plant Cell Rep.—1990.— 8.— P. 617—620.
12. Quesnel A. A., Ellis B. E. Comparison of UV irradiation and *p*-Fluorophenylalanine as selective agents for production of aromatic compounds in plant cell cultures // J. Biotechnology.—1989.— 10.— P. 27—38.
13. Zakhlenjuk O. V., Vidmachenko T. V., Kunakh V. A. et al. Comparative characteristics of shikonin accumulating *Arnebia euchroma* suspension culture and its *p*-fluorophenylalanine-resistant variant // Acta Horticulturae.—1993.— 330.— P. 293—298.
14. Давыденков В. Н., Патудин А. В., Попов Ю. Г. и др. Культура клеток *Arnebia euchroma* (Royle) jonsi.— новый источник получения шиконина // Хим.-фарм. журнал.— 1991.— № 1.— С. 53—55.
15. Tabata M., Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures // Biotechnol. in plant sci. Relevance to agriculture in eighties / Ed. M. Zaitlin.— New York: Acad. press, 1985.— P. 207—218.
16. Quesnel A. A., Ellis B. E. Population responses in tobacco cell cultures during selection for resistance to *para*-fluorophenylalanine // Plant Sci.—1987.— 49.— P. 223—229.
17. Flick C. E., Jensen R. A., Evans D. A. Isolation, protoplast culture and plant regeneration of PFP-resistant variants of *Nicotiana tabacum* Su/Su // Z. Pflanzen.—1981.— 103.— P. 239—245.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 23.11.93