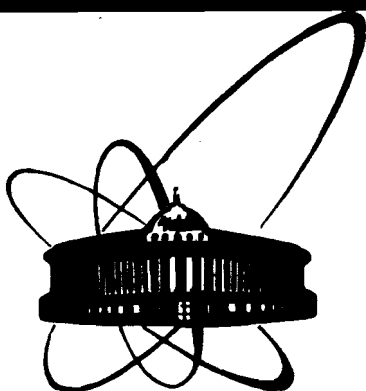


89-610



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

Г 247

P19-89-610

Э.Гацек, Э.Н.Исмаилова

**ИНДУКЦИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
К АНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЕ
С ПОМОЩЬЮ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

1989

Культура клеток руты душистой является интересной модельной системой для изучения биосинтеза акридоновых алкалоидов. Акридоновые алкалоиды относятся к числу природных веществ, обладающих высокой физиологической активностью. Для изучения физиологических и биохимических закономерностей их биосинтеза нами использованы штаммы руты душистой, полученные в результате длительной селекционной работы и обладающие различной степенью проявления в них биосинтетических потенций. В работе [1] была показана высокая радиостойчивость штамма продуцента R-20 руты душистой к гамма-лучам, причем облучение практически не изменяло биосинтетической активности ткани. В дальнейшей работе на нейтронах наряду с интересными эффектами, описанными в [2], была также показана различная радиостойчивость штамма-продуцента R-20 и штамма R-15, синтезирующего в культуре следы алкалоида рутакридона. Причина столь высокой радиорезистентности шт. R-20 пока не ясна, но можно предположить, что рутакридон является радиопротектором для штамма продуцента. В этой связи представилось интересным попытаться найти пути повышения биосинтеза рутакридона в штамме R-15 с последующим определением его радиочувствительности, что в положительном случае могло служить косвенным доказательством того, что алкалоид рутакридон или его биосинтез обладают радиозащитным эффектом. Одним из возможных путей повышения биосинтеза рутакридона является введение в питательную среду предшественника, участвующего в биосинтезе данного алкалоида. Нами была выбрана антралиловая кислота /АК/, так как она является соединением, лежащим на пути его биосинтеза. Прямое введение предшественника в питательную среду ингибирует рост ткани, результаты представлены ниже, поэтому мы применили гамма-облучение в малой дозе, с целью стимулирования роста ткани и последующей дальнейшей селекции мутантных штаммов, устойчивых к присутствию АК в питательной среде и одновременно способных употреблять антралиловую кислоту из питательной среды. Выведение таких штаммов-селектантов - цель настоящей работы.

Материал и методы

В работе использованы каллусы руты душистой, штамм R-15, полученный из Института физиологии растений АН СССР, Москва. Ткани выращивались на среде Мурасиге и Скуга с добавлением ауксина 2,4 Д в концентрации 1 мг/л и кинетина 1 мг/л, в темноте, при $t=26^{\circ}\text{C}$. Облучение осуществлялось с помощью установки СВЕТ с источником Cs^{137} мощностью дозы 8 рад/с, в дозе 100 рад. Облученный каллус высаживался на питательную среду с добавлением АК в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ м/л. Концентрацию алкалоида рутакридона определяли в спиртовом растворе на спектрофотометре при длине волны 400 нм [2].

Селекция каллусов на устойчивость к АК проводилась с учетом внешних морфологических отличий, ростового индекса и по концентрации алкалоида рутакридона. Динамику роста ткани определяли разработанным нами фотометрическим методом, описанным в [3].

Результаты и обсуждение

Рис.1 иллюстрирует влияние различных концентраций антраниловой кислоты на рост и развитие каллусной ткани руты душистой шт. R-15. Наблюдения за ростом каллусов на среде с добавлением АК показали, что концентрации от $1 \cdot 10^{-4}$ м/л до $2,5 \cdot 10^{-4}$ м/л вызывают торможение роста ткани и частичный некроз ткани, а концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ м/л $1 \cdot 10^{-3}$ м/л — не только сильное торможение, но и сильный некроз, что в дальнейшем приведет к гибели ткани. В табл. 1 приводятся данные концентраций рутакридона в тканях, выращенных на среде с добавлением разных концентраций АК. Из этих опытов видно, что простое введение АК не повышает биосинтез рутакридона. Причиной такой реакции может быть токсичное действие АК на ткань или результат обратного ингибирования антранилсинтетазы, одного из ферментов антранилат синтетазы. Такой механизм был показан для 5-метилтриптофана [4].

С целью избежания подобных отрицательных эффектов мы воспользовались радиационным мутагенезом с последовательной селекцией мутантов, применив малую дозу гамма-облучения /100 рад/ для стимулирования роста ткани. Облученный каллус высаживали на среду с добавлением АК в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ м/л и

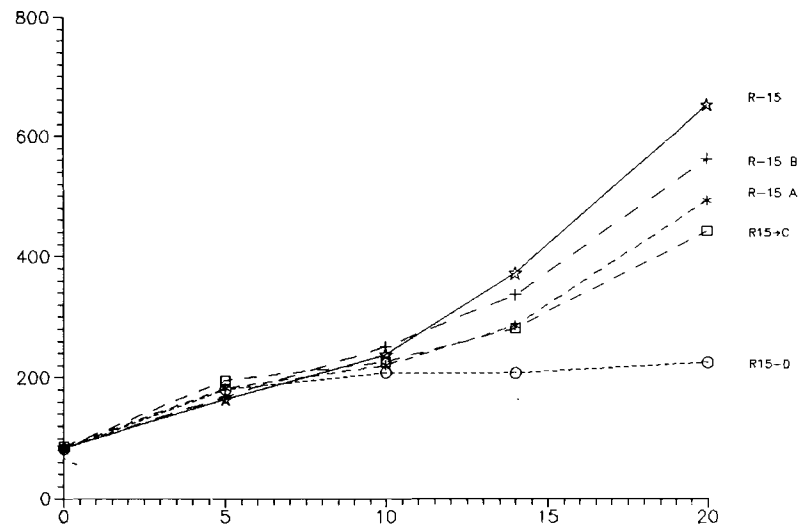


Рис.1. Влияние разных концентраций АК на рост растительной ткани руты душистой штамма R-15. По оси абсцисс время [сутки], по оси ординат — сухой вес ткани, в мг. Кривая R-15 — динамика роста контрольного штамма. Кривая R-15 A — динамика роста при добавлении АК в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ м/л, кривая R-15 B — АК $2,5 \cdot 10^{-4}$ м/л, кривая R-15 C — АК $5,0 \cdot 10^{-4}$ м/л, кривая R-15 D — $1 \cdot 10^{-3}$ м/л.

Т А Б Л И Ц А 1

ШТАММ	Концентрация антраниловой кислоты в среде	Концентрация рутакридона в мг/г
R - 15	-	0.0565 ± 0.0053
R - 15γ 21/1	-	0.1736 ± 0.0345
R - 15γ 21/2	-	0.1693 ± 0.0234
R - 15	$1 \cdot 10^{-4}$	0.0544 ± 0.0075
R - 15	$2.5 \cdot 10^{-4}$	0.0582 ± 0.0099
R - 15	$5 \cdot 10^{-4}$	0.0777 ± 0.0049
R - 15	$1 \cdot 10^{-3}$	0.0499 ± 0.0057
R - 15γ 21/1	$1 \cdot 10^{-4}$	0.3075 ± 0.0139
R - 15γ 21/1	$2.5 \cdot 10^{-4}$	0.3236 ± 0.0346
R - 15γ 21/1	$5 \cdot 10^{-4}$	0.3387 ± 0.0232
R - 15γ 21/1	$1 \cdot 10^{-3}$	0.3570 ± 0.0205
R - 15γ 21/2	$1 \cdot 10^{-4}$	0.3074 ± 0.0203
R - 15γ 21/2	$2.5 \cdot 10^{-4}$	0.3114 ± 0.0179
R - 15γ 21/2	$5 \cdot 10^{-4}$	0.3291 ± 0.0234
R - 15γ 21/2	$1 \cdot 10^{-3}$	0.3490 ± 0.0340

продолжили селекцию лучших образцов по признаку хорошего ростового индекса и повышенной биосинтетической активности. В таблице 2 представлена выборка лучших селектантов после 7 пассажей, выращенных на среде с добавлением АК в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ м/л. Как видно из таблицы 2, селектанты

ТАБЛИЦА 2

ШТАММ	Ростовой индекс	Концентрация рутакридона в мг/г
R - 15γ4	5.0	0.2204
R - 15γ5	5.5	0.1375
R - 15γ6	6.5	0.0769
R - 15γ19	6.8	0.0609
R - 15γ20	7.4	0.1815
R - 15γ21/1	10.2	0.1736
R - 15γ21/2	10.8	0.1693
R - 15γ23	4.0	0.4295
R - 15γ26	6.5	0.1802
R - 15γ26/2	6.3	0.1679
R - 15γ37	6.0	0.1878
R - 15 control	7.4	0.0534

R-15γ21/1 и R-15γ21/2 обладают отличным ростовым индексом и стабильной повышенной концентрацией рутакридона. И для дальнейших опытов мы выбрали эти селектанты. Чтобы наглядно убедиться в приобретении новых свойств /резистентности к АК и т.п./ мы провели опыт с селектантами R-15 21/1 и R-15 21/2 и контрольным штаммом R-15, высаживая на среды с разным содержанием АК в 4 вариантах; А- $1 \cdot 10^{-4}$ м/л; В- $2,5 \cdot 10^{-4}$ м/л; С- $5 \cdot 10^{-4}$ м/л; Д- $1 \cdot 10^{-3}$ м/л. На гистограммах 1, 2 и рис. 1-5 наглядно показана разница между селектантами и контрольным штаммом. Даже на среде, в которую добавлена АК в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ м/л, селектанты выглядят неплохо (см. фото) и способны к дальнейшей репродукции, а контрольный штамм погиб вследствие некроза. Анализируя данные по динамике роста селектантов, представленных на рис. 2-5, на средах с добавлением АК и без нее, очевидно, что наши селектанты не только привыкли к АК, но и растут лучше в ее присутствии, обладая при этом повышенным биосинтезом алкалоида рутакридона, почти на порядок, в сравнении

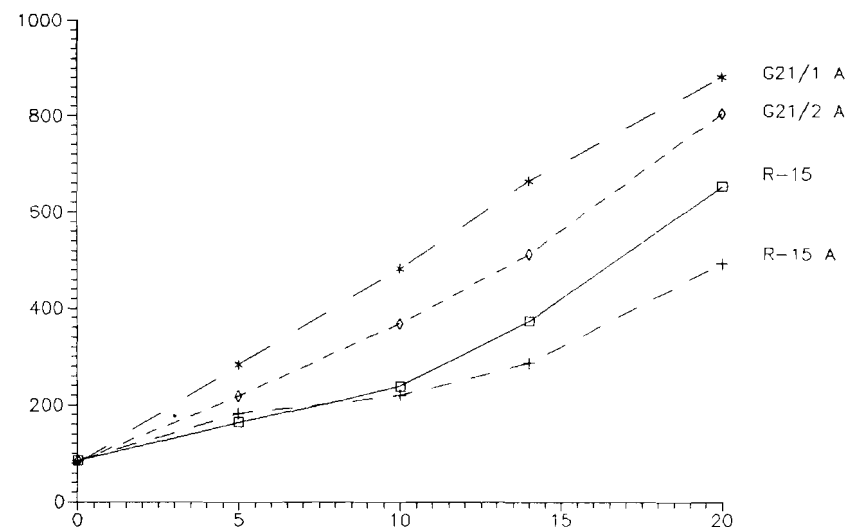


Рис.2. Влияние АК в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ м/л на рост селектантов γ21/1, γ21/2 и контрольного штамма R-15. По оси абсцисс - время, сутки, по оси ординат - сырой вес в мг. Кривая R-15 - контроль, посаженный без АК, кривая R-15A - контроль, посаженный на среду с добавлением АК.

с исходным штаммом R-15 (табл. 1). Данные о сохранении новых приобретенных свойств при дальнейшем пассировании ткани свидетельствуют о том, что в тканях R-15γ21/1 и R15γ21/2 произошли генетические изменения.

Таким образом, простое добавление антралиловой кислоты в питательную среду приводит к торможению роста ткани, некрозу и гибели, особенно для концентраций, больших, чем $5 \cdot 10^{-4}$ м/л, в этих случаях существенного увеличения концентраций рутакридона не наблюдалось.

Использование малой дозы гамма-облучения с последующей селекцией ткани способствовало выведению новых штаммов, обладающих устойчивостью к антралиловой кислоте в среде и повышенной концентрацией алкалоида рутакридона.

Рис.3. Влияние АК в концентрации В $2,5 \cdot 10^{-4}$ м/л на рост селектантов $\gamma 21/1$, $\gamma 21/2$ и контрольного штамма R-15. По оси абсцисс - время, сутки, по оси ординат - сырой вес в мг. Кривая R-15 - контроль, посаженный без АК, кривая R-15 В - контроль, посаженный на среду с добавлением АК.

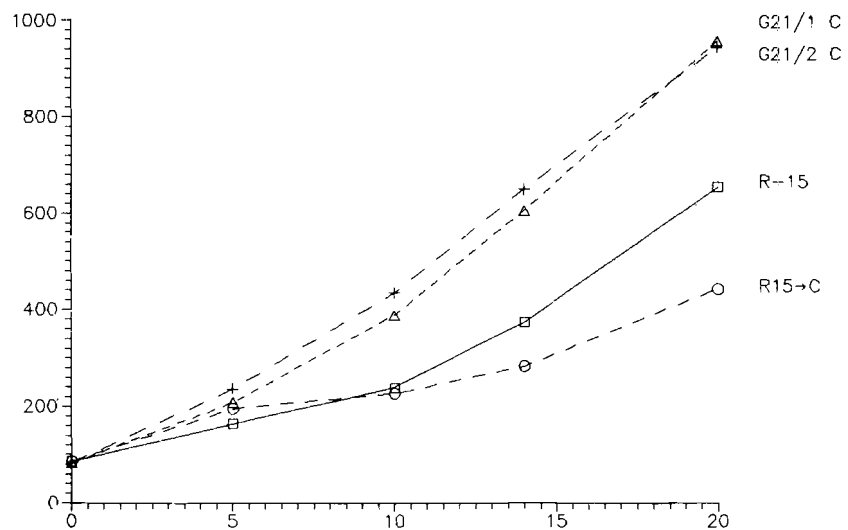
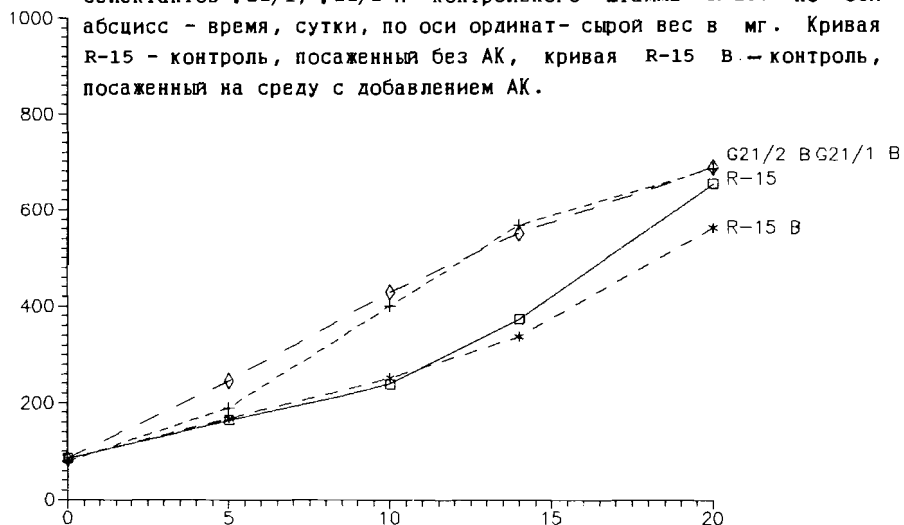
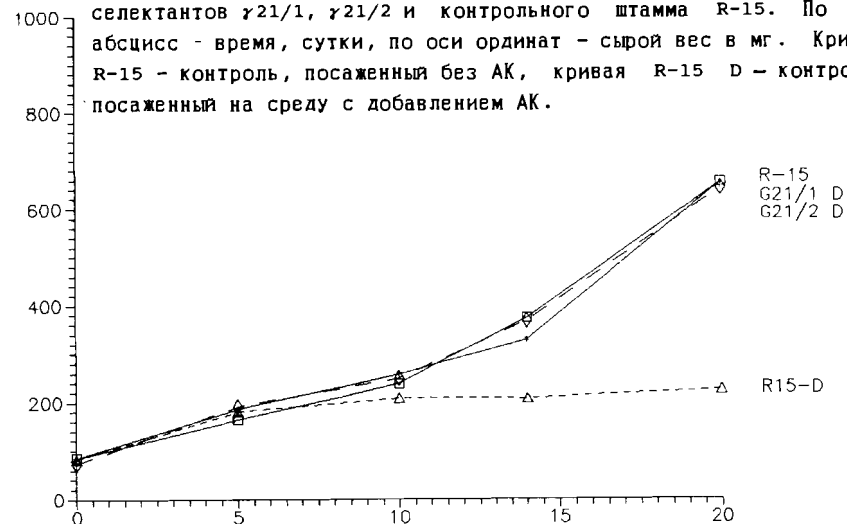
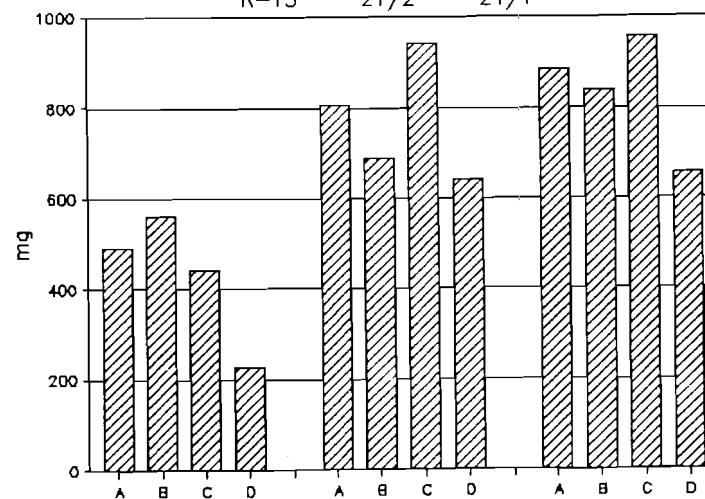


Рис.4. Влияние АК в концентрации С $5,0 \cdot 10^{-4}$ м/л на рост селектантов $\gamma 21/1$, $\gamma 21/2$ и контрольного штамма R-15. По оси абсцисс - время, сутки, по оси ординат - сырой вес в мг. Кривая R-15 - контроль, посаженный без АК, кривая R-15 с - контроль, посаженный на среду с добавлением АК.

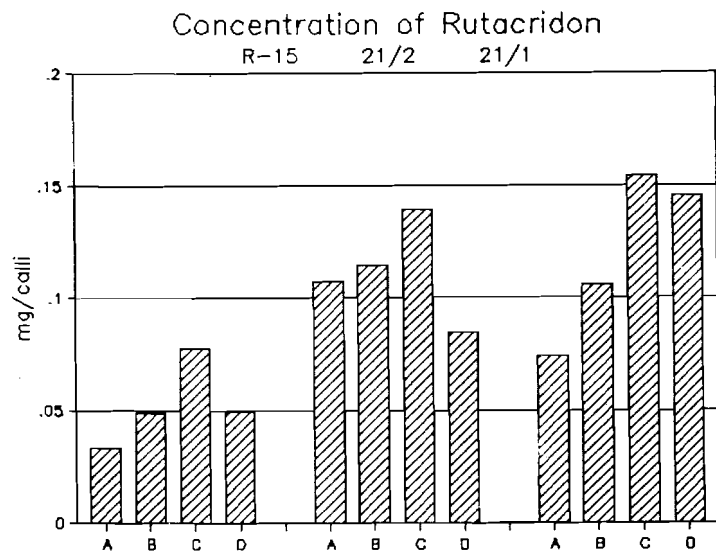
Рис.5. Влияние АК в концентрации D $1,0 \cdot 10^{-3}$ м/л на рост селектантов $\gamma 21/1$, $\gamma 21/2$ и контрольного штамма R-15. По оси абсцисс - время, сутки, по оси ординат - сырой вес в мг. Кривая R-15 - контроль, посаженный без АК, кривая R-15 D - контроль, посаженный на среду с добавлением АК.



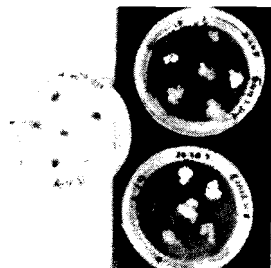
Grows of the callus
R-15 21/2 21/1



Гистограмма 1. Сравнение роста каллусов контроля R-15 и селектантов $\gamma 21/1$, $\gamma 21/2$. По оси абсцисс - концентрации АК: А - $1,0 \cdot 10^{-4}$ м/л, В - $2,5 \cdot 10^{-4}$ м/л, С - $5,0 \cdot 10^{-4}$ м/л, D - $1,0 \cdot 10^{-3}$ м/л. По оси ординат - сырой вес, в мг.



Гистограмма 2. Сравнение концентраций рутакридона контроля R-15 и селектантов $\gamma 21/1$, $\gamma 21/2$. По оси абсцисс концентрации АК, по оси ординат - концентрация рутакридона, в мг на каллус.



На белом фоне - чашка с контрольным штаммом R-15, посаженным на среду с АК в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ м/л. На темном фоне - чашки с селектантами R15 γ 21/1 и R15 γ 21/2, посаженными на такую же среду, что и контрольный штамм R-15.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузовкина И.Н. и др. - Физиология растений, № 2, с. 409, 1983.
2. Гацек Э. и др. - Сообщение ОИЯИ, P19-86-853, Дубна, 1986.
3. Гацек Э., Исмаилова Э.Н. - ОИЯИ, P19-89-45, Дубна, 1989.
4. Widholm J.M. - Biochim. et Biophys. Acta, 261., p. 44-51, 1972.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 августа 1989 года.

Гацек Э., Исмаилова Э.Н.

P19-89-610

Индукция резистентности растительных клеток к антралиловой кислоте с помощью ионизирующего излучения

Представлен один из возможных путей повышения биосинтеза алкалоида рутакридона в растительной ткани руты душистой. Показано, что простое добавление АК/антралиловой кислоты/ в питательную среду приводит к торможению роста ткани, некрозу и гибели. В этом случае существенного увеличения биосинтеза рутакридона не наблюдалось. Использование малой дозы γ -облучения с последующей селекцией способствовало выведению новых штаммов, обладающих устойчивостью к АК в среде и повышенным биосинтезом алкалоида рутакридона.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989

Перевод Т.Ф.Дроздовой

Gacek E., Ismailova E.N.

P19-89-610

Ionizing Radiation Induction of Plant Cell Resistance to Anthranilic Acid

A possible way to increase the biosynthesis of the alkaloid rutacridone by *Ruta graveolens* is given. A simple addition of anthranilic acid to the nutrient media leads to the arrest of growth, to the necrose and finally to the death of the plant tissue culture. No enhancement of rutacridone's biosynthesis was observed. By means of the low dose γ -radiation and further selection there was obtained a new strain of *Ruta graveolens* with increased resistance to anthranilic acid and enhanced biosynthesis of the alkaloid rutacridone.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1989