

УДК 581.1

ПОГЛОЩЕНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТКАМИ СОИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

С.Г. ШВЕЦОВ, А.Г. ЕНИКЕЕВ

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук
664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 1243*

Обнаружено, что клетки суспензионной культуры сои быстро поглощали из питательной среды $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$, а затем выделяли это вещество обратно. Доля выделившейся $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ была наибольшей при использовании пролиферативно активных концентраций 2,4-Д. Эта кислота выделялась из клеток также в присутствии ряда веществ — физиологических аналогов ауксина. Сделан вывод, что ведущим фактором необычной динамики 2,4-Д в исследуемой культуре является специфическая реакция клеток сои на 2,4-Д как ауксин.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., соя, культура клеток, ауксин, 2,4-Д.

Экзогенные ауксины (ИУК, НУК, 2,4-Д и др.) широко используются в культурах изолированных органов и тканей растений как стимуляторы деления и дифференциации клеток [2]. Для управления этими процессами необходимо знать принципы регуляции содержания ауксинов в клетках. Соответствующие исследования активно проводились в 1970-е и в первой половине 1980-х годов, однако впоследствии интерес к этой проблеме значительно ослабел.

Ранее мы рассмотрели закономерности динамики содержания ауксинов в ряде накопительных (периодических) культур клеток и тканей растений [4] и показали, что равновесное распределение экзогенного ауксина между средой и клетками происходит в течение 20—40 мин после его внесения в культуру. Одной из основных закономерностей динамики ауксинов в исследуемых культурах было неуклонное уменьшение их содержания в среде, однако в суспензионной культуре сои мы наблюдали необычное явление: после первоначального быстрого поглощения 2,4-Д около 2/3 поглощенного вещества выделялось обратно в среду. Подобное поведение изредка отмечали и другие авторы [3, 5] для производных феноксиуксусной кислоты при поглощении их тканями растений из растворов, но причины необычной динамики не выяснены.

Можно предполагать, что необычная динамика 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в исследуемой культуре обусловлена или неспецифической реакцией (стрессом) клеток на манипуляции с ними [6], или ее действием на клетки как ауксина. Цель настоящего исследования — проверка этих предположений.

Методика

Суспензионную культуру клеток сои (*Glycine max* (L.) Merr.) получали из семядольного каллуса и поддерживали еженедельным пересевом [1]. Для проведения опытов культуру переводили на 14-суточный цикл культивирования с использованием в качестве ауксина 2,4-Д (10^{-6} М). Инокулят выросшей суспензии переносили в свежую среду, не содержащую ауксин, или в среду, выделенную из выросшей суспензии того же возраста (кондиционированная среда). Разбавление суспензии клеток при этом составляло 1:10, рН среды корректировали добавлением в нее H_3PO_4 или КОН.

В приготовленную для опытов суспензию клеток вносили [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д (ВО «Изотоп», удельная активность 1810 МБк/мМ) или [$1\text{-}^{14}\text{C}$]бензойную кислоту (ВО «Изотоп», удельная активность 1250 МБк/мМ) в количестве 400 Бк/мл суспензии. Концентрацию меченой 2,4-Д изменяли добавлением соответствующего количества немеченого соединения.

Для изучения влияния химических и физиологических аналогов на распределение [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д одновременно с ней в колбы с суспензией клеток вносили то или иное немеченое соединение: ИУК, α -НУК, *L*-триптофан, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,5-Т), 2,4,6-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,6-Т), β -нафтилуксусную кислоту (β -НУК), 2-хлорфеноксиуксусную кислоту (2-ХФУК), 4-хлорфеноксиуксусную кислоту (4-ХФУК), 2,3,5-трийодбензойную кислоту (ТИБК), 2,4-ДНФ. Концентрация немеченых соединений в среде культивирования составляла при этом 10^{-5} М, [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д — $2,5 \cdot 10^{-7}$ М.

Через определенные интервалы времени после внесения изучаемых соединений в культуру пипеткой отбирали пробы (5–10 мл) суспензии для анализа. Клетки отделяли от среды на стеклянном фильтре. Вещества из клеток экстрагировали 80 %-м ацетоном, радиоактивность среды и экстракта определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике RackBeta 1219 (ЛКВ, Швеция) с использованием сцинтилляционной жидкости на основе диоксана (6 г РРО, 0,6 г РОРОР, 60 г нафталина в 1 л диоксана). Для определения меченых метаболитов 2,4-Д использовали ТСХ на пластинках Silufol в системе растворителей изопропанол — 25 %-й аммиак — вода (10:1:1).

Эксперименты, проведенные трижды с тремя аналитическими повторностями в каждом варианте опыта, дали сходные результаты. В таблице и на рисунках представлены результаты отдельных экспериментов с указанием средних значений величин и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Динамика поглощения клетками сои [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д ($2,5 \cdot 10^{-6}$ М) представлена на рис. 1. В течение первых 40–50 мин [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д быстро поглощалась клетками. После достижения максимума радиоактивность клеток начинала уменьшаться, а радиоактивность среды — увеличиваться. Выделение метки происходило медленнее, чем начальное ее поглощение: минимальная радиоактивность клеток достигалась примерно через 3 ч после начала эксперимента. В старой (кондиционированной) среде максимальное поглощение [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д клетками было в 1,5 раза выше, чем в свежей. Выделение метки в обоих вариантах продолжалось в течение

2–2,5 ч и заканчивалось примерно на одном уровне. Хроматографический анализ среды и спиртового экстракта из клеток показал, что их радиоактивность представлена неметаболизированной 2,4-Д.

Динамика поглощения $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты при ее исходной концентрации в среде 10^{-6} М имела обычный характер — в наблюдаемый период времени она только накапливалась в клетках (см. рис. 1, кривая 3).

Зависимость максимального (через 45 мин инкубации) и минимального (через 180 мин инкубации) содержания 2,4-Д в клетках от ее начальной концентрации в среде представлена на рис. 2. Из него видно, что в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-6} М начальное (за первые 45 мин) поглощение метки возрастает. Более высокие концентрации вызывают его уменьшение. Поглощенная метка при концентрации 2,4-Д в среде 10^{-7} – $2,5 \cdot 10^{-7}$ М из клеток не выделялась. Повышение концентрации 2,4-Д до $2,5 \cdot 10^{-6}$ М сначала вызывало усиление выделения метки, а затем его уменьшение до полного исчезновения эффекта при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М.

В таблице представлены результаты определения влияния разных химических веществ на поглощение $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М). Установлено, что все испытанные соединения не оказывали заметного влияния на начальное поглощение $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д за исключением ТИБК, которая существенно увеличивала начальное поглощение 2,4-Д.

Метка из клеток выделялась при наличии соединений ауксинового типа действия: ИУК, α -НУК, 2,4,5-Т, 4-ХФУК и ТИБК. Вещества, не обладающие ауксиновой активностью (β -НУК, 2-ХФУК, *L*-триптофан), и антиауксин 2,4,6-Т не влияли на распределение $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в культуре.

Можно было предположить, что в основе самопроизвольного выделения 2,4-Д из клеток лежит стрессовая реакция клеток на изменение условий культивирования [6], однако поглощенная $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д из клеток

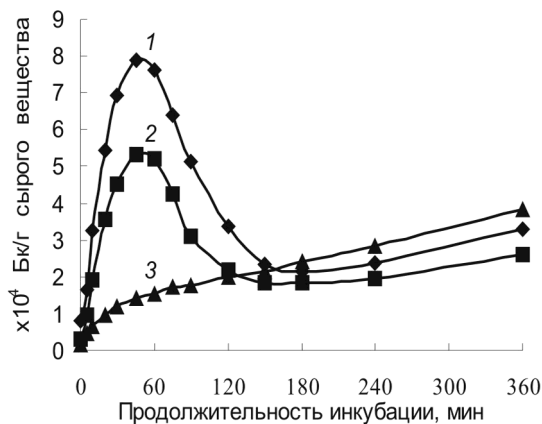


Рис. 1. Динамика содержания $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д (1, 2) и $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты (3) в клетках сои в суспензионной культуре (1 — кондиционированная среда; 2, 3 — свежая). Исходная концентрация $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д и $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты в среде — $2,5 \cdot 10^{-6}$ М

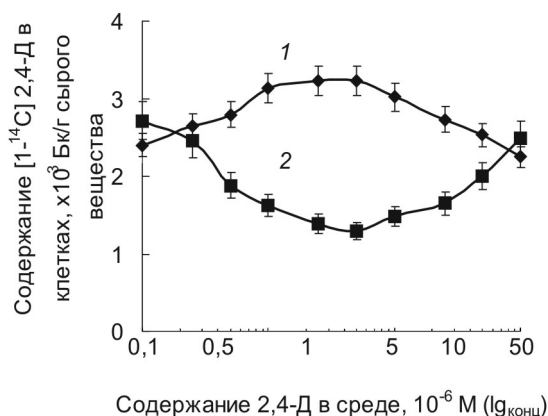


Рис. 2. Влияние концентрации нерадиоактивной 2,4-Д в среде суспензионной культуры сои на содержание $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в клетках через 45 (1) и 180 мин (2) после начала инкубации. Исходная концентрация $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в среде — 10^{-7} М

Влияние различных соединений (10^{-5} М) на поглощение $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М) клетками суспензионной культуры сои ($\times 10^3$ Бк/г сырого вещества)

| Соединение | Продолжительность инкубации, мин | |
|---------------|----------------------------------|-------------|
| | 45 | 180 |
| Контроль | 4,72 ± 0,51 | 5,19 ± 0,44 |
| ИУК | 5,60 ± 0,52 | 3,13 ± 0,33 |
| α -НУК | 5,77 ± 0,60 | 2,47 ± 0,22 |
| β -НУК | 5,25 ± 0,53 | 5,93 ± 0,48 |
| 2,4,5-Т | 5,80 ± 0,53 | 3,14 ± 0,29 |
| 2,4,6-Т | 5,17 ± 0,50 | 4,60 ± 0,47 |
| 4-ХФУК | 5,73 ± 0,47 | 3,50 ± 0,38 |
| 2-ХФУК | 5,27 ± 0,49 | 5,82 ± 0,48 |
| ТИБК | 7,12 ± 0,65 | 2,82 ± 0,30 |
| L-Триптофан | 5,18 ± 0,42 | 5,43 ± 0,51 |

выделялась как в свежей, так и в кондиционированной среде. Кроме того, динамика содержания в клетках $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты (соединения, сходного с 2,4-Д по химическому строению) в то же время имела обычный характер (см. рис. 1), поэтому выделение поглощенной $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ не является стрессовой реакцией клеток на их перенос в среду иного состава и другие манипуляции с ними.

Процесс выделения наблюдался в интервале концентраций 2,4-Д, которые обычно используются для стимуляции процессов пролиферации и дифференциации в изолированных культурах клеток и тканей растений и только при наличии соединений, обладающих ауксиновой активностью (ИУК, α -НУК, 2,4,5-Т, 4-ХФУК) или влияющих на транспорт ауксинов (ТИБК) [2]. Поэтому можно полагать, что выделение поглощенной $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ в исследуемой культуре было специфической реакцией клеток на наличие самой 2,4-Д как ауксина.

1. Гамбург К.З., Высоцкая Е.Ф., Леонова Л.А. и др. Влияние разных ауксинов на рост табака и сои в суспензионной культуре // Докл. АН СССР. — 1972. — **203**. — С. 714—717.
2. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах клеток и тканей растений. — Новосибирск: Наука. СО, 1990. — 243 с.
3. Жирмунская Н.М. Проникновение органических гербицидов в клетки растений // Физиология растений. — 1975. — **226**, № 2. — С. 408—420.
4. Швецов С.Г., Гамбург К.З. Поглощение и метаболизм 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в суспензионной культуре клеток кукурузы и сои // Там же. — 1980. — **27**, № 4. — С. 746—755.
5. Jenner C.F., Saunders P.F., Blackman G.E. The uptake of growth substances. X. The accumulation of phenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by segments of *Avena mesocotyle* // J. Exp. Bot. — 1968. — **19**, N 59. — P. 333—352.
6. Thoiron B., Thoiron A., Le Guiel J. et al. Solute uptake of *Acer pseudoplatanus* cell suspensions during recovery from gas shock // Physiol Plant. — 1979. — **44**, N 4. — P. 351—356.

Получено 18.12.2008

ПОГЛИНАННЯ І ВИДІЛЕННЯ КЛІТИНАМИ СОЇ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСІОЦТОВОЇ
КИСЛОТИ В СУСПЕНЗІЙНІЙ КУЛЬТУРІ

С.Г. Швецов, А.Г. Єнікеев

Сибірський інститут фізіології та біохімії рослин Сибірського відділення Російської академії наук, Іркутськ

Виявлено, що клітини суспензійної культури сої швидко поглинали з поживного середовища $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$, а потім виділяли цю речовину назад. Частка виділеної $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ була найбільшою в разі використання проліферативно активних концентрацій 2,4-Д. Ця кислота виділялась із клітин також за наявності низки речовин — фізіологічних аналогів ауксину. Зроблено висновок, що провідним чинником незвичайної динаміки 2,4-Д у досліджуваній культурі є специфічна реакція клітин сої на 2,4-Д як ауксин.

ABSORPTION AND EMISSION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID BY SOYA
CELLS IN SUSPENSIVE CULTURE

S.G. Shvetsov, A.G. Enikeev

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
P.O.Box 1243, 132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russia

Cells suspension culture of soya absorbed $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ from a nutrient medium quickly, and then allocated this substance back. The share of allocated 2,4-D was the greatest at use prolific active concentration 2,4-D. Allocation 2,4-D from cells was observed also at presence of some other substances — physiological analogues of auxin. The conclusion is done, that the leading factor of unusual 2,4-D dynamics in investigated culture is specific reaction of cells of soya on 2,4-D as auxin.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., cell culture, auxin, 2,4-D.