

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 феноксисукусной кислоты при поглощении их тканями растений из растворов, но причины необычной динамики не выяснены.

Можно предполагать, что необычная динамика 2,4-дихлорфеноксисукусной 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$  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,  $\alpha$ -НУК, *L*-триптофан, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,5-Т), 2,4,6-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,6-Т),  $\beta$ -нафтилуксусную кислоту ( $\beta$ -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,  $\alpha$ -НУК, 2,4,5-Т, 4-ХФУК и ТИБК. Вещества, не обладающие ауксиновой активностью ( $\beta$ -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

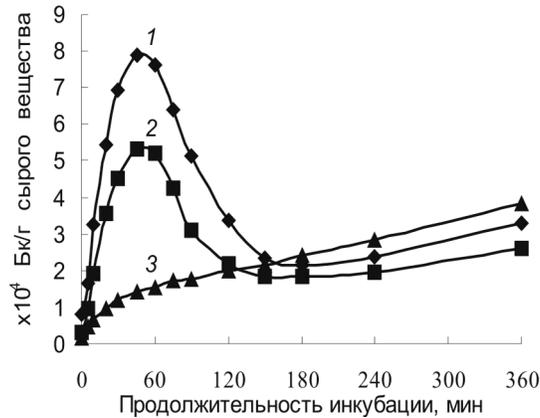


Рис. 1. Динамика содержания  $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д (1, 2) и  $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты (3) в клетках сои в суспензионной культуре (1 — кондиционированная среда; 2, 3 — свежая). Исходная концентрация  $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д и  $[1-^{14}\text{C}]$ бензойной кислоты в среде —  $2,5 \cdot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

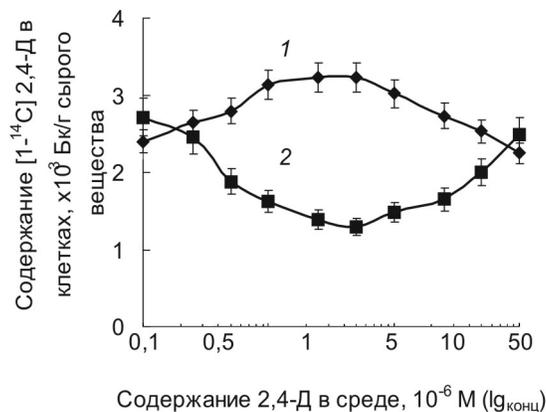


Рис. 2. Влияние концентрации нерадиоактивной 2,4-Д в среде суспензионной культуры сои на содержание  $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в клетках через 45 (1) и 180 мин (2) после начала инкубации. Исходная концентрация  $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в среде —  $10^{-7}$  М

Влияние различных соединений ( $10^{-5}$  М) на поглощение [ $1-^{14}\text{C}$ ]2,4-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
$\alpha$ -НУК	5,77 ± 0,60	2,47 ± 0,22
$\beta$ -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-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,  $\alpha$ -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-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-ДИХЛОРОФЕНОКСІОЦТОВОЇ  
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.