

УДК 581.1

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОГЛОЩЕНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ 2,4-Д В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СОИ

С.Г. ШВЕЦОВ, А.Г. ЕНИКЕЕВ

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

Изучали причины самопроизвольного выделения 2,4-Д из клеток после ее интенсивного поглощения в суспензионной культуре сои. Бензойная кислота, в отличие от яблочной, при наличии 2,4-Д также сначала поглощалась клетками, а затем выделялась обратно в среду. Дициклогексилкарбодиимид снижал начальное накопление 2,4-Д клетками и тормозил ее выделение. Фаза выделения сопровождалась повышением содержания в клетках яблочной кислоты. Предполагается, что наблюдаемые эффекты определяются как химическими свойствами 2,4-Д, так и регуляторным влиянием этого соединения на рН цитоплазмы, благодаря последовательной активации мембраносвязанных и цитоплазматических систем рН-стата клетки.

Ключевые слова: *Glucine max* L., культура клеток, ауксин, поглощение, 2,4-Д, дициклогексилкарбодиимид, яблочная кислота.

2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) является одним из наиболее часто используемых в методе культур клеток растений синтетических ауксинов. Для понимания механизмов физиологического действия этого соединения необходимо знать закономерности формирования его действующей концентрации в клетках [3].

В суспензионной культуре сои начальное поглощение 2,4-Д клетками сменялось ее выделением. При этом содержание некоторых ионов колебалось [4, 5]. Было предположено, что в основе наблюдаемых эффектов лежат изменения рН внутриклеточной среды, вызванные регуляторным воздействием самой 2,4-Д, однако существенных доказательств этого предположения получено не было. Известно, что рН внутриклеточной среды регулируется мембраносвязанными H^+ -АТФазами, H^+ -пирофосфатазами, играющими роль протонных помп, и рядом ферментов, связанных с метаболизмом яблочной кислоты, формирующих клеточный рН-стат [6, 7, 9].

Целью настоящей работы было выяснение взаимосвязи особенностей поглощения 2,4-Д в суспензионной культуре сои с ее химическими свойствами как слабой липофильной кислоты и с функционированием основных (мембраносвязанных и цитоплазматических) систем рН-стата клетки. Для этого динамику поглощения $[1-^{14}C]2,4-Д$ сравнивали с динамикой поглощения других органических кислот, различающихся по химическим свойствам — $[1-^{14}C]$ бензойной (слабая липофильная кисло-

та, химический аналог 2,4-Д) и [$1\text{-}^{14}\text{C}$]яблочной. Роль мембраносвязанных систем рН-стата оценивали по влиянию на поглощение 2,4-Д дициклогексилкарбодиимида, цитоплазматических систем — по изменению в ходе экспериментов внутриклеточного содержания яблочной кислоты.

Методика

Суспензионная культура клеток сои *Glycine max* (L.) Merr. была получена из семядольного каллюса и поддерживалась путем еженедельного пересева [2]. Для проведения опытов культуру переводили на 14-суточный цикл культивирования с использованием в качестве ауксина 2,4-Д (0,2 мг/л). Выросшую суспензию клеток разбавляли в 10 раз средой (рН 6,0, в течение опытов это значение не изменялось), выделенной из культуры клеток того же возраста. В зависимости от цели эксперимента в колбы с приготовленной суспензией вносили совместно или отдельно немеченую 2,4-Д (1,0 мг/л), [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д (0,1 мг/мл), [$1\text{-}^{14}\text{C}$]бензойную кислоту (БК) (5 мг/мл), [$1\text{-}^{14}\text{C}$]яблочную кислоту (ЯК) (5 мг/мл) и специфический ингибитор H^+ -АТФаз дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) (5 мг/мл).

Через определенные промежутки времени после внесения меченых соединений в культуру пипеткой отбирали пробы суспензии по 5—10 мл для анализа. Клетки отделяли от среды на стеклянном фильтре отсасыванием. Интенсивность поглощения [$1\text{-}^{14}\text{C}$]2,4-Д и [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ЯК определяли по радиоактивности, поглощенной клетками за 5 мин после определенных периодов инкубации с нерадиоактивной 2,4-Д и ДЦКД. Радиоактивность среды и биомассы измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике RackBeta 1219 (ЛКВ, Швеция), непосредственно помещая пробы во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости на основе диоксана (6 г РРО, 0,6 г РОРОР, 60 г нафталина в 1 л диоксана).

Содержание ЯК в клеточной массе находили с помощью набора реактивов для определения *L*-яблочной кислоты (R-Biopharm, «Roche») по прилагаемой методике, содержание свободной 2,4-Д и БК — с использованием ТСХ на пластинках «Силуфол» в системах растворителей изопропанол (25 %-й)—аммиак—вода (10 : 1 : 1) и *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (5 : 1 : 2).

Эксперименты проводили трижды с четырьмя аналитическими повторностями в каждом варианте опытов. В таблицах и на рисунках представлены результаты отдельных экспериментов с указанием средних значений величин и стандартной погрешности.

Результаты и обсуждение

Поглощение [$1\text{-}^{14}\text{C}$]БК без наличия 2,4-Д в исследуемой культуре было непрерывным, без резких колебаний (рис. 1). При наличии 2,4-Д характер распределения [$1\text{-}^{14}\text{C}$]БК становился подобным распределению 2,4-Д в ее действующей концентрации [4]: начальный период интенсивного поглощения (0—40 мин) сменялся ее выделением из клеток (см. рис. 1). Затем поглощение возобновлялось с более медленной скоростью. Поглощение [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ЯК в обоих вариантах не прерывалось, наблюдались небольшие изменения его скорости при наличии 2,4-Д (рис. 2).

В процессе инкубирования способность клеток сои к поглощению 2,4-Д изменялась (табл. 1). При активной концентрации 2,4-Д 1,0 мг/л

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОГЛОЩЕНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ

ТАБЛИЦА 1. Изменение интенсивности поглощения $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ (кБк/г сырого вещества за 5 мин) клеточной массой при наличии нерадиоактивной 2,4-Д (1,0 мг/л) в суспензионной культуре сои

Продолжительность инкубации, мин	0	20	40	90	120
Содержание $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$, кБк/г сырого вещества	8,5±1,3	19,2±2,5	15,1±2,6	6,7±1,1	8,6±1,8

интенсивность поглощения $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ увеличивалась за первые 15 мин инкубации почти в 2 раза и уменьшалась в 1,5 раза через 90 мин (на этапе выделения) по сравнению с ее начальным значением.

Специфический ингибитор H^+ -АТФазы ДЦКД уменьшал первоначальное накопление $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$. При этом максимальное содержание $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ в клетках стабилизировалось на достигнутом уровне в течение 120–150 мин, после чего выделение этого соединения возобновлялось (рис. 3).

В процессе инкубации с 2,4-Д в клетках увеличивалось общее содержание ЯК, в то время как удельная активность (отношение поглощенной метки за 5 мин к общему ее содержанию на данный момент времени) заметно уменьшалась (табл. 2). Добавление в суспензию клеток ДЦКД тормозило повышение содержания ЯК и снижение ее удельной активности. Интенсивность поглощения $[1-^{14}\text{C}]ЯК$ в обоих вариантах существенно не различалась. Данные этого опыта показали, что этап выделения 2,4-Д совпадал с увеличением в клетках содержания ЯК, а уменьшение ее удельной активности — с усилением новообразования этого соединения.

Соединения $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-Д}$ и $[1-^{14}\text{C}]БК$ при наличии 2,4-Д имели сходную динамику распределения между клетками и средой, а $[1-^{14}\text{C}]ЯК$ такую особенность не проявляла. БК так же, как и 2,4-Д, является слабой липофильной кислотой, ЯК обладает более сильными кислотными свойствами и низкой липо-

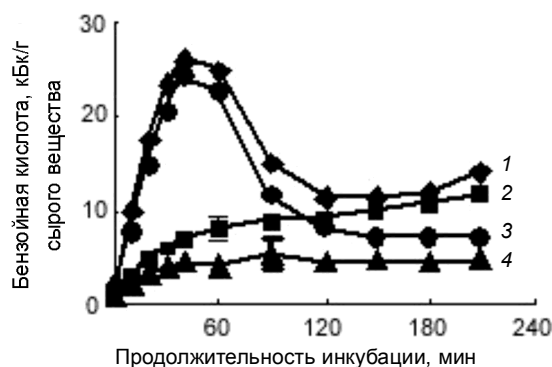


Рис. 1. Поглощение $[1-^{14}\text{C}]БК$ клеточной массой в суспензионной культуре сои:

1, 3 — при наличии 2,4-Д; 2, 4 — без 2,4-Д; 1, 2 — общее содержание $[1-^{14}\text{C}]БК$ и ее метаболитов; 3, 4 — содержание свободной $[1-^{14}\text{C}]БК$

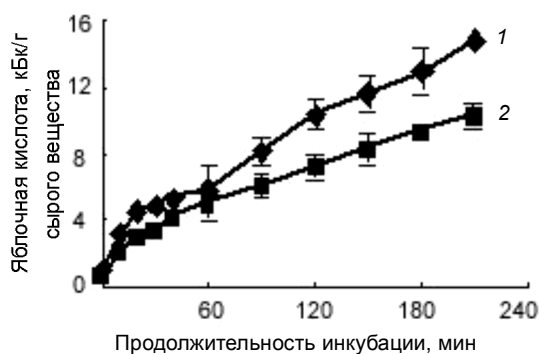


Рис. 2. Поглощение $[1-^{14}\text{C}]ЯК$ клеточной массой в суспензионной культуре сои при наличии (1) и при отсутствии (2) 2,4-Д

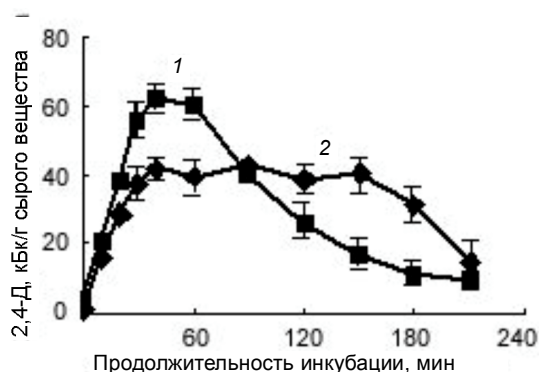


Рис. 3. Влияние дициклогексилкарбодиимида на поглощение $[1-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ клеточной массой в суспензионной культуре сои:

1 — контроль; 2 — ДЦКД, 5 мг/л

цитоплазмой и средой и, наоборот, снижается при увеличении этого градиента [8]. Поскольку в ходе наших экспериментов pH среды оставался постоянным (около 6,0), можно полагать, что изменение способности клеток к поглощению 2,4-Д и БК связано с изменением кислотности внутриклеточной среды.

Под действием экзогенных ауксинов через 5–10 мин инкубирования пыльцевых зерен *Petunia hybrida* внутриклеточный pH повышался, как полагают авторы работы, в результате активации выноса протонов H^+ -АТФазой [1]. Результаты наших опытов (см. табл. 1), в которых скорость поглощения меченой 2,4-Д в начальный период инкубирования увеличивалась, а поглощение этого соединения при наличии ДЦКД ингибировалось (см. рис. 3), подтверждают возможность защелачивания цитоплазмы клеток сои в результате активации H^+ -АТФазы самой 2,4-Д.

Повышение содержания ЯК в клетках могло вызвать значительное подкисление внутриклеточной среды [6], нарушение условий распределения 2,4-Д и БК и, в конечном счете, привести к их выделению. Этот вывод подтверждает расчет внутриклеточного значения pH, проведенный по методу Рубери и Шелдрейк [10] для моментов максимального

фильностью. Поэтому можно предположить, что необычная динамика поглощения 2,4-Д связана не с особенностями поглощения этого соединения как ауксина, а с особенностями поглощения слабых липофильных кислот в условиях регуляторного действия 2,4-Д. Известно, что поглощение клетками растений экзогенных ауксинов (ИУК, НУК, 2,4-Д) как слабых липофильных кислот усиливается при снижении градиента pH между

ТАБЛИЦА 2. Изменение содержания яблочной кислоты в клетках суспензионной культуры сои при наличии 2,4-Д и ДЦКД

Показатель	Вариант	Продолжительность инкубации, мин		
		20	120	180
Содержание ЯК, мг/г сырого вещества	1	1,35±0,22	2,17±0,21	2,30±0,28
	2	1,46±0,18	1,51±0,20	1,68±0,19
Поглощение $[1-^{14}\text{C}]ЯК$, кБк/г сырого вещества	1	8,52±1,04	9,71±0,89	10,0±0,56
	2	8,81±1,17	8,35±0,97	9,27±1,00
Удельная активность $[1-^{14}\text{C}]ЯК$, кБк/мг	1	6,31	4,47	4,34
	2	6,03	5,53	5,51

Примечание. Вариант 1 — инкубирование при наличии 2,4-Д; вариант 2 — инкубирование при наличии 2,4-Д и ДЦКД.

(через 40 мин инкубации, рН 7,7) и минимального (через 180 мин инкубации, рН 6,9) содержания 2,4-Д и БК в клетках.

Причины переключения режима защелачивания цитоплазмы на режим ее подкисления остаются невыясненными. Можно предположить, что смене физиологического состояния клетки будут способствовать такие факторы, как ингибирование H^+ -АТФазы избытком 2,4-Д, изменение концентрации эндогенных регуляторов (в том числе ионного состава и рН), изменение энергетического обеспечения процессов, ответственных за регуляцию рН цитоплазмы.

1. Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Минкина Ю.В., Ковалева Л.В. Изменения внутриклеточного рН пыльцевых зерен *Petunia hybrida* под действием экзогенных фитогормонов // Физиология растений. — 2007. — **54**, № 5. — С. 707—714.
2. 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**, № 3. — С. 714—717.
3. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах клеток и тканей растений. — Новосибирск: Наука, 1990. — 243 с.
4. Швецов С.Г., Еникеев А.Г. Поглощение и выделение клетками сои 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в суспензионной культуре // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 4. — С. 359—363.
5. Швецов С.Г., Еникеев А.Г. Поглощение, выделение 2,4-Д и рубидия в суспензионной культуре клеток сои в зависимости от рН среды и наличия 2,4-динитрофенола // Там же. — 2011. — **43**, № 4. — С. 339—343.
6. Davies D.D. The fine control of cytosolic pH // *Physiol. Plant.* — 1986. — **67**. — P. 702—706.
7. Felle H. Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: a study carried out with double-barrelled pH micro-electrodes // *J. Exp. Bot.* — 1987. — **38**. — P. 340—354.
8. Goldsmith M.H.M. The polar transport of auxin // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1977. — **28**. — P. 439—478.
9. Hager A. Role of plasma membrane H^+ -ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects // *J. Plant Res.* — 2003. — **116**. — P. 483—505.
10. Rubery P.H., Sheldrake A.R. Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin // *Nature New Biol.* — 1973. — **244**, N 5414. — P. 285—288.

Получено 01.03.2012

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПОГЛИНАННЯ, ВИДІЛЕННЯ І РЕГУЛЯТОРНОЇ ДІЇ 2,4-Д В СУСПЕНЗІЙНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН СОЇ

С.Г. Швецов, А.Г. Єнікєєв

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

Вивчали причини самовільного виділення 2,4-Д з клітин після її інтенсивного поглинання в суспензійній культурі сої. Бензойна кислота, на відміну від яблучної, за наявності 2,4-Д також спочатку поглиналась клітинами, а потім виділялась назад у середовище. Диклогексилкарбодімід знижував початкове накопичення 2,4-Д клітинами і гальмував її виділення. Фаза виділення супроводжувалась підвищенням вмісту в клітинах яблучної кислоти. Припущено, що спостережувані ефекти визначаються як хімічними властивостями 2,4-Д, так і регуляторним впливом цієї сполуки на рН цитоплазми, завдяки послідовній активації мембранозв'язаних і цитоплазматичних систем рН-стату клітини.

INTERRELATION OF ABSORPTION, EMISSION AND REGULATORY ACTIONS OF 2,4-D IN SOYA SUSPENSION CULTURE

S.G. Shvetsov, A.G. Enikeev

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

The reasons of the spontaneous secretion of the 2,4-D from cells following its intensive absorption by cells in soybean suspension culture were investigated. Benzoic acid, unlike the malic acid, in the presence of the 2,4-D also was absorbed by the cells and then released by them into medium. Dicyclohexylcarbodiimide reduced initial accumulation of the 2,4-D by cells and slowed down its following release. Period of 2,4-D releasing was accompanied by increase of the malic acid content in cells. It was suggested that observed effects are determined both the 2,4-D chemical properties and regulatory action of this compound on the cell cytoplasm pH resulted from consequential activation of membrane and cytoplasm pH-stat.

Key words: *Glycine max* L., cell culture, auxin, absorption, 2,4-D, dicyclohexylcarbodiimide, malic acid.