

УДК 581.1

ПОГЛОЩЕНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ 2,4-Д И РУБИДИЯ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СОИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ pH СРЕДЫ И НАЛИЧИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА

С.Г. ШВЕЦОВ, А.Г. ЕНИКЕЕВ

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

Установлено, что в процессе распределения $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д между клеточной массой и средой в суспензионной культуре сои поглотительная способность клеток изменялась: $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д сначала интенсивно поглощалась клетками, а затем частично выделялась обратно в среду. Характерное для контроля равновесное содержание $^{86}\text{Rb}^+$ в клетках после добавления в питательную среду 2,4-Д также сначала увеличивалось, а затем уменьшалось. Особенности распределения $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д и $^{86}\text{Rb}^+$ между клетками и средой зависели от pH среды и наличия 2,4-динитрофенола. Предположено, что изменение поглотительной способности клеток сои связано с действием 2,4-Д на мембранный транспорт протонов.

Ключевые слова: *Glucine max* (L.) Merr., культура клеток, 2,4-Д, поглощение, выделение.

Экзогенные ауксины (ИУК, НУК, 2,4-Д и др.) широко используются в культурах изолированных органов и тканей растений как стимуляторы размножения и дифференциации клеток. Ауксины представляют собой слабые липофильные кислоты, степень диссоциации которых зависит от pH среды. Нейтральные молекулы ауксинов в отличие от анионов легко проникают сквозь плазмалемму путем простой диффузии и концентрируются в цитоплазме, кислотность которой обычно ниже, чем внешнего раствора. Диффузионный поток нейтральных молекул ауксинов дополняется транспортом анионов с участием специфических переносчиков [9, 10]. Роль опосредованного транспорта 2,4-Д через плазмалемму, по-видимому, невелика [6].

В накопительной суспензионной культуре клеток сои наблюдался необычный феномен: внесенная в суспензию 2,4-Д сначала быстро поглощалась клетками, а затем выделялась обратно в среду. Такой характер распределения 2,4-Д между клетками и средой был связан с регуляторными свойствами этого вещества, но его механизм остался невыясненным [4]. Одной из первых реакций растительных клеток на ауксины является изменение трансмембранного градиента протонов [3], с которым, возможно, было связано необычное перераспределение 2,4-Д в культуре сои.

Целью настоящей работы было выяснение взаимосвязи реакции клеток на 2,4-Д и ее распределения в системе среда—клетки. Для этого изучено влияние pH среды и 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) на поглоще-

ние и выделение $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д, а также зависимость распределения $^{86}\text{Rb}^+$ между клетками и средой от наличия 2,4-ДНФ и 2,4-Д в суспензионной культуре сои.

Методика

Суспензионную культуру клеток сои (*Glycine max* (L.) Merr.) получали из семядольного каллуса и поддерживали путем еженедельного пересева [1]. Для проведения опытов культуру переводили на 14-суточный цикл культивирования с использованием в качестве ауксина 2,4-Д (0,2 мг/л). Готовую суспензию клеток разбавляли в 10 раз средой (рН 6,0), выделенной из готовой суспензии того же возраста. В зависимости от цели эксперимента в колбы с разбавленной суспензией клеток вносили $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д ($2,5 \cdot 10^{-6}$ М) или $^{86}\text{RbCl}$ (уд. активность 74 МБк/г) в количестве 2,0 кБк на 1 мл суспензии. В отдельных опытах одновременно с $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д или через 40 мин инкубации в суспензию клеток вносили 2,4-ДНФ до концентрации его в среде 10^{-5} М. Кислотность (рН) среды доводили до заданного значения добавлением определенного заранее количества H_3PO_4 или КОН.

Через определенные промежутки времени после внесения изучаемых соединений в культуру пипеткой отбирали пробы суспензии по 5 мл для анализа. Клетки отделяли от среды на стеклянном фильтре. Содержание меченых соединений в среде и биомассе определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика RackBeta 1219 (ЛКВ, Швеция), непосредственно помещая пробы среды или клеточной массы во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости на основе диоксана (6 г РРО, 0,6 г РОРОР, 60 г нафталина в 1 л диоксана).

Эксперименты проводили трижды с четырьмя аналитическими повторностями в каждом варианте опытов. На рисунках представлены результаты отдельных экспериментов с указанием средних значений величин. Стандартная погрешность не превышала 8 %.

Результаты и обсуждение

Характер и динамика распределения 2,4-Д между клетками и средой в суспензионной культуре сои зависели от рН среды (рис. 1). При рН 4,5

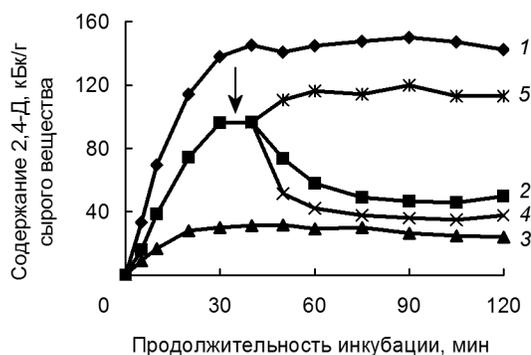


Рис. 1. Влияние рН среды на содержание в клетках $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в суспензионной культуре сои (стрелкой обозначен момент изменения рН):

1—5 — рН соответственно 4,5; 6,0; 7,5; 7,0; 5,0

и 7,5 характер распределения $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в культуре был обычным (без выделения из клеток). Максимальный уровень $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в клетках фиксировали через 30—40 мин, при рН 4,5 он был в 4,6 раза выше, чем при рН 7,5. Максимальное содержание 2,4-Д в клетках при рН среды 6,0 также достигалось через 30—40 мин и было в 3 раза выше, чем при рН 7,5. Затем в течение 60—90 мин 2,4-Д выделялась из клеток до уровня, в 2 раза ниже наи-

высшего. Выделение $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д из клеток не наблюдалось, если в момент достижения ее максимального содержания в среду добавляли H_3PO_4 и снижали рН среды до 5,0. Если же в этот момент в суспензию клеток добавляли щелочь, повышая рН до 7,0, то процесс выделения $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д из клеток ускорялся.

Известно, что рН внутриклеточной среды изменяется в узких пределах и слабо зависит от рН окружающего клетки раствора [7]. Поэтому, регулируя рН среды, можно изменять градиент электрохимического потенциала протонов ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) на плазмалемме клеток и тем самым влиять на диффузионное поглощение слабых липофильных кислот, к которым относится 2,4-Д [2, 5, 8, 10]. Полученные нами данные подтвердили, что при увеличении этого градиента, т.е. при подкислении среды, поглощение 2,4-Д усиливается, а при подщелачивании — ослабевает. Известно также, что одним из первых регуляторных эффектов ауксинов, в том числе и 2,4-Д, является активация локализованной на плазмалемме протонной помпы и повышение $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, с которым связано усиление поглощения растительными клетками различных соединений [3].

Накопление $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д клетками уменьшалось, а ее выделение не наблюдалось, когда одновременно с $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в суспензию клеток вносили ингибитор протонной помпы — 2,4-ДНФ (рис. 2). Если 2,4-ДНФ вносили через 20 мин после $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д, то метка переставала поступать в клетки и ускоренно выделялась обратно в среду.

В процессе распределения 2,4-Д между клеточной массой и средой изменялась способность клеток к поглощению не только этого соединения, но и катионов. В исследуемой культуре довольно быстро (в течение 3—4 ч) достигалось состояние равновесного (или близкого к нему) распределения $^{86}\text{Rb}^+$ между клетками и средой. Внесение 2,4-Д (0,5 мг/л) в клеточную суспензию нарушало это состояние (рис. 3). В течение первых 20 мин содержание $^{86}\text{Rb}^+$ в клеточной массе на 19 % увеличивалось, а в последующие 45—60 мин — на 23 % уменьшалось по срав-

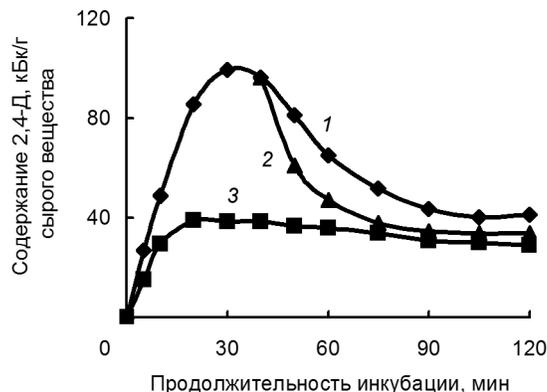


Рис. 2. Влияние 2,4-ДНФ на содержание в клетках $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д в суспензионной культуре сои:

1 — без внесения 2,4-ДНФ; 2 — внесение 2,4-ДНФ через 20 мин после $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д; 3 — внесение 2,4-ДНФ одновременно с $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д

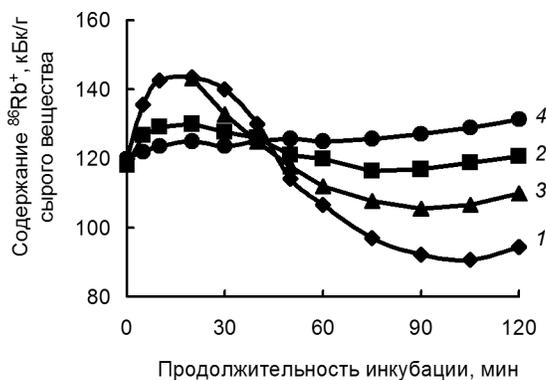


Рис. 3. Влияние 2,4-Д и 2,4-ДНФ на содержание в клетках $^{86}\text{Rb}^+$ в суспензионной культуре сои:

1 — внесение 2,4-Д без 2,4-ДНФ; 2 — внесение 2,4-Д и 2,4-ДНФ одновременно; 3 — внесение 2,4-ДНФ через 20 мин после 2,4-Д; 4 — контроль

нению с исходным уровнем. 2,4-ДНФ, внесенный в культуру одновременно с 2,4-Д, снижал интенсивность колебаний содержания $^{86}\text{Rb}^+$. Результаты опытов подтвердили, что под влиянием 2,4-Д клетки сначала поглощали, а затем выделяли $^{86}\text{Rb}^+$ в среду. Ингибитор протонной помпы 2,4-ДНФ уменьшал поглощение 2,4-Д, усиливал выделение ее из клеток, а также снижал влияние 2,4-Д на распределение $^{86}\text{Rb}^+$ между клетками и средой в исследуемой культуре. Полученные результаты дают основание предполагать, что в начальный период (2–3 ч) взаимодействия клеток сои с содержащейся в слабокислой инкубационной среде (рН 6,0) 2,4-Д в ее физиологически активной концентрации градиент $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ на плазмалемме сначала увеличивался, а затем — уменьшался. Сперва это стимулировало поглощение 2,4-Д и $^{86}\text{Rb}^+$ клетками, потом вызывало их частичное выделение. Следовательно, изменение поглотительной способности клеток сои в суспензионной культуре связано с действием 2,4-Д на мембранный транспорт протонов.

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**, № 3. — 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. Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений. — Л.: Наука, 1986. — 80 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. Clark K.A., Goldsmith M.H.M. Effect of surface and membrane potentials on IAA uptake and binding by zucchini membrane vesicles // Plant hormone receptors / Ed. D. Klambt. — Proc. NATO. — Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. — P. 99–112.
6. Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells // Planta. — 1996. — **198**. — P. 532–541.
7. Raven J.A., Smith F.A. Effect of temperature and external pH on the cytoplasmic pH of *Chara corallina* // J. Exp. Bot. — 1978. — **29**, N 111. — P. 853–866.
8. Raven J.A. Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to the pH and electrical gradients and its significance for polar IAA transport // New Phytol. — 1975. — **74**, N 2. — P. 163–172.
9. Rubery P.H., Shelldrake A.R. Carrier-mediated auxin transport // Planta. — 1974. — **118**, N 2. — P. 101–102.
10. Rubery P.H., Shelldrake A.R. Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin // Nature New Biol. — 1973. — **244**, N 5414. — P. 285–288.

Получено 16.03.2010

ПОГЛИНАННЯ, ВИДІЛЕННЯ 2,4-Д І РУБІДІЮ В СУСПЕНЗІЙНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН СОЇ ЗАЛЕЖНО ВІД рН СЕРЕДОВИЩА І НАЯВНОСТІ 2,4-ДИНІТРОФЕНОЛУ

С.Г. Швецов, А.Г. Енікеев

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

Виявлено, що у процесі розподілу $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д між клітинною масою і середовищем у суспензійній культурі сої поглинальна здатність клітин змінювалась: $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д спочатку інтенсивно поглиналась клітинами, а потім частково виділялась назад у середовище. Характерний для контролю рівноважний вміст $^{86}\text{Rb}^+$ у клітинах після додавання в поживне середовище 2,4-Д також спочатку збільшувався, а потім зменшувався. Особливості розподілу $[1-^{14}\text{C}]$ 2,4-Д і $^{86}\text{Rb}^+$ між клітинами і середовищем залежали від рН середовища і наявності

ПОГЛОЩЕНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ 2,4-Д И РУБИДИЯ

2,4-динітрофенолу. Зроблено припущення, що зміна поглинальної здатності клітин сої пов'язана з дією 2,4-Д на мембранний транспорт протонів.

ABSORPTION AND EMISSION OF 2,4-D AND RUBIDIUM IN SOYA SUSPENSION CULTURE DEPENDING ON pH OF MEDIUM AND PRESENCE OF 2,4-DNP

S.G. Shvetsov, A.G. Enikeev

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

The absorbing ability of the soya cells in culture was changed during distribution process of [1-¹⁴C] 2,4-D between cells and medium. In the beginning of exposure [1-¹⁴C] 2,4-D was absorbed intensively by the cells and later partially secreted back in the medium. The content of ⁸⁶Rb⁺ in the cells after addition to the nutrient medium 2,4-D at first also increased, and then decreased. The character of [1-¹⁴C] 2,4-D and ⁸⁶Rb⁺ distribution between cells and the medium depended on the medium pH and presence of 2,4-DNP. It is assumed, that changes, in the absorbing ability of the soya cells in the suspension culture are caused by 2,4-D action on membrane transport of protons.

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