

К. З. ГАМБУРГ, Е. Ф. ВЫСОЦКАЯ, Л. М. ОШАРОВА,
Л. А. ЛЕОНОВА, В. И. ЮЗЕНАСОВ

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ АУКСИНОВ НА РОСТ ТКАНЕЙ ТАБАКА И СОИ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

(Представлено академиком М. Х. Чайлахяном 21 IV 1971)

Одним из условий, необходимых для получения каллусов и поддержания их роста в изолированной культуре, является присутствие в питательной среде ауксина (¹, ²). Наиболее широкое применение при культуре изолированных тканей имеют индолилуксусная кислота (ИУК), α -нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Однако выбор того или иного ауксина в большинстве работ не обоснован достаточно полными количественными данными об их активности на изучавшихся объектах.

Целью настоящей работы явился выбор ауксина, наилучшим образом способствующего росту тканей табака и сои в суспензионной культуре, и подбор оптимальных для роста концентраций.

Использовалась культура ткани табака, растущая в суспензии более 2 лет (³). Каллусная ткань, выделенная из семядоли сои, была получена нами от Л. Г. Брежетовой (Биолого-почвенный институт Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток) и переведена для выращивания в суспензии в январе 1970 года. Суспензию ткани сои поддерживали в культуре, пересевая ее на свежую среду в разведении 1 : 10 каждые 10—14 дней. Обе культуры выращивали на среде Мурашиге и Скуга (⁴) с добавлением 2% сахарозы, 0,4 мг/л тиамина, 0,1 мг/л пиридоксина, 80 мг/л инозита и НУК (2 мг/л для ткани табака и 1 мг/л для сои).

Для закладки опытов выросшую суспензию разбавляли в 10 раз свежей средой без НУК и разливали по 4 мл в пробирки 16 × 150 мм, в которые предварительно вносили разные количества ИУК, НУК или 2,4-Д. Пробирки помещали в наклонный барабан, который приводился во вращение со скоростью 50—60 об/мин, и выдерживали в темноте при 26°. Суспензию табака анализировали через 5 дней, а суспензию сои через 7 дней. Для этого суспензию из каждой пробирки переносили на стеклянный фильтр № 2, среду отсасывали, ткань взвешивали и мацерировали 20—30 мин. 10% раствором хромового ангидрида. Подсчет количества клеток проводили в камере Фукса — Розенталя не менее 8 раз для каждой мацерированной навески. Чтобы получить представление о размерах клеток, высчитывали сырой вес ткани, приходящийся на 1 миллион клеток. У ткани сои, кроме того, подсчитывали количество клеток со вторичными утолщениями оболочек (ксилемные клетки). Опыты были повторены два раза, в каждом варианте опыта было по 3—4 пробирки. Средняя квадратичная ошибка при определении сырого веса и количества клеток составляла 5—7%, при подсчете ксилемных клеток 10—12%.

На рис. 1А представлены результаты испытания действия разных ауксинов на ткань табака. Видно, что наиболее активным в стимуляции размножения клеток ауксином была 2,4-Д. Из табл. 2 можно видеть, что 2,4-Д приблизительно в 10 раз более активна, чем НУК, и в 300 раз более активна, чем ИУК. В то же время при увеличении концентрации ауксинов сырой вес ткани уменьшался (табл. 1). Это обусловлено тем, что, как уже

сообщалось ранее (^{2, 5}), в отсутствие ауксина и при низких его концентрациях происходит увеличение размеров клеток.

Как следует из рис. 1Б и табл. 2, у ткани сои 2,4-Д была в 30 раз более активна, чем НУК, и в 250 раз более активна, чем ИУК. При этом НУК обеспечивала более высокий максимум реакции, чем 2,4-Д и ИУК. Возможно, это связано с более низкой токсичностью НУК или продуктов ее

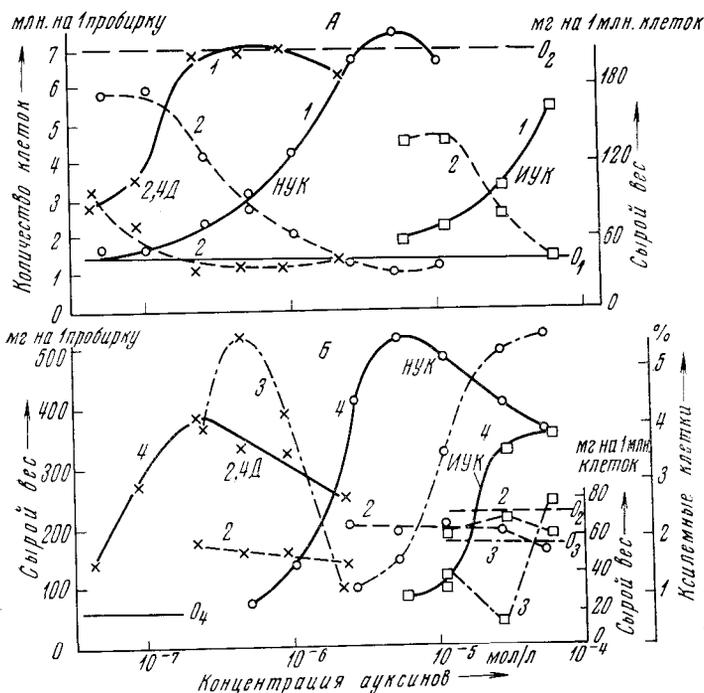


Рис. 1. Влияние различных концентраций ИУК, НУК и 2,4-Д на количество (1), размеры (2) клеток, процент ксилемных клеток (3) и сырой вес (4) в суспензионной культуре ткани табака (А) и сои (Б). O₁, O₂, O₃, O₄ — количество, размеры, клеток, процент ксилемных клеток и сырой вес соответственно на среде без ауксинов

метаболизма. В отличие от табака, размеры клеток практически не менялись у ткани сои при изменении концентрации ауксинов и в их отсутствие. Все испытанные ауксины вызывали увеличение количества ксилемных клеток при возрастании концентрации. При этом максимумы этой реакции наблюдались при более высоких концентрациях ауксинов, чем максимумы роста.

Таким образом, испытанные ауксины имеют разную величину биологической активности, но не обнаруживают качественных различий в действии

Таблица 1

Влияние ауксинов на сырой вес ткани табака в суспензионной культуре, в мг на 1 пробирку

| Ауксины | Концентрация ауксинов, мг/л | | | | | | | | | | |
|---------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| | 0 | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,50 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 |
| 2,4-Д | 292 | 265 | 238 | 217 | 222 | 246 | 253 | — | — | — | — |
| НУК | — | 281 | 285 | 285 | 264 | 261 | 259 | 239 | 224 | — | — |
| ИУК | — | — | — | — | — | — | — | 315 | 313 | 276 | 238 |

Таблица 2

Сравнительная активность 2,4-Д, НУК и ИУК в стимуляции роста тканей табака и сои в суспензионной культуре

| Ауксин | Табак | | Соя | |
|--------|-------------------------------|------|--------------------------------|-----|
| | 1: C _{1/2} | % | 1: C _{1/2} | % |
| 2,4-Д | 1: (1,2 · 10 ⁻⁷ M) | 100 | 1: (0,75 · 10 ⁻⁷ M) | 100 |
| НУК | 1: (1,1 · 10 ⁻⁶ M) | 11,3 | 1: (2,24 · 10 ⁻⁶ M) | 3,3 |
| ИУК | 1: (4,1 · 10 ⁻⁵ M) | 0,3 | 1: (1,78 · 10 ⁻⁵ M) | 0,4 |

Примечание. C_{1/2} — концентрация, необходимая для получения половины максимального эффекта.

вию на ткани по тем характеристикам, которые анализировались в данной работе.

Чрезвычайно низкая активность ИУК по сравнению с синтетическими ауксинами в культурах тканей табака и сои находится в резком противоречии с тем, что наблюдалось для других биологических объектов (^{6,7}), где ИУК была в 2 раза активнее НУК и в 4 раза активнее 2,4-Д (отрезки колосоптилей овса, гипокотилей подсолнечника).

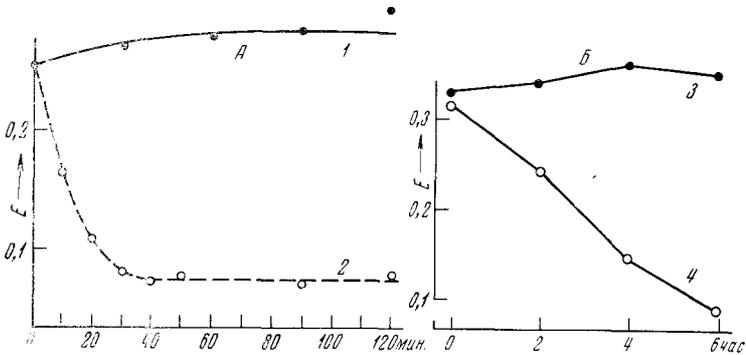


Рис. 2. Динамика разрушения ИУК: А — неочищенной (1) и очищенной на сефадексе Г-25 (2) ферментной вытяжке из ткани табака, выращенной на среде с НУК 2 мг/л; Б — при инкубации раствора ИУК с культуральной жидкостью (3) и с суспензией ткани табака (4). Е — оптическая плотность окраски ИУК с реактивом Сальковского.

В колбы Эрленмейера вносили 11 мл фосфатного буфера, pH 6,1, 4 мл раствора ИУК 10⁻³ M и 5 мл выросшей суспензии ткани табака или культуральной жидкости из этой суспензии. Инкубацию проводили в темноте, на качалке при 26°. Каждые 2 часа отбирали 1–2 мл реакционной среды и добавляли двукратный объем реактива Сальковского

Так как одним из способов инактивации ИУК является ее окисление ИУК-оксидазой, мы провели определение активности этого фермента в культуре ткани табака по ранее описанной методике (⁸). Как показывает рис. 2А, неочищенная ферментная вытяжка не разрушала ИУК в течение 2 и более (до 6) час. После очистки на сефадексе Г-25 почти вся ИУК разрушалась за 30 мин. Полученные данные показывают, что в ткани табака имеется активная ИУК-оксидаза и ингибитор ИУК-оксидазы. При инкубации живой ткани с раствором ИУК 2 × 10⁻⁴ мол/л без кофакторов ИУК-оксидазы (Mn²⁺, дихлорфенол) за 6 час. разрушалось 75% ИУК, тогда как культуральная жидкость без ткани была не активна (рис. 2Б). Предварительные опыты с ИУК-C¹⁴ООН показали, что за 48 час. инкубации суспензии почти вся радиоактивность выделяется в виде C¹⁴О₂. Полученные данные во многом согласуются с результатами, полученными при работе с культурами тканей других растений (^{9,10}), где также отмечалась

активность интактных тканей в разрушении ИУК и неактивность гомогенатов из-за освобождения при гомогенизации низкомолекулярного ингибитора ИУК-оксидазы.

Таким образом, несмотря на наличие ингибитора ИУК-оксидазы, ткань табака разрушает ИУК со скоростью, достаточной для объяснения ее низкой ауксинной активности. Более низкая активность ИУК по сравнению с 2,4-Д может быть, по-видимому, связана с ее превращением в неактивную нафтилацетиласпарагиновую кислоту⁽¹¹⁾, хотя экспериментальная проверка этого предположения в наших опытах не проводилась.

В результате проведенной работы было сделано заключение, что наиболее удобной для работы с суспензионными культурами тканей табака и сои является ИУК в концентрации 1 мг/л.

Сибирский институт физиологии
и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
21 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Gautheret, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 6, 433 (1955). ² Р. Г. Бутенко, Культура тканей изолированных и физиология морфогенеза растений, М., 1964.
³ Л. А. Леонова, Л. В. Гаманец, К. З. Гамбург, *Физиол. раст.*, 17, 731 (1970).
⁴ T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. plantarum*, 15, 473 (1962). ⁵ К. З. Гамбург, В. Н. Маркович и др., *ДАН*, 174, 729 (1967). ⁶ R. M. Muir, C. Hansch, *Plant Physiol.*, 28, 218 (1953). ⁷ L. Brauner, R. Diemer, *Planta*, 77, 1 (1967). ⁸ К. З. Гамбург, Сборн. Методы определения регуляторов роста и гербицидов, М., 1966, стр. 57. ⁹ J. Lipetz, A. W. Galston, *Am. J. Bot.*, 46, 193 (1959). ¹⁰ J. Straus, R. K. Gerding, *Plant Physiol.*, 38, 621 (1963). ¹¹ M. Kazemie, D. Klämbt, *Physiol. plantarum*, 22, 489 (1969).