

Г. С. БЫЧКОВА, Р. Г. БУТЕНКО

**ДЕЙСТВИЕ АУКСИНА И КИНЕТИНА НА МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ
ЧАСТИЧНО СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК
ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО (PANAX GINSENG С. А. MEY)
IN VITRO**

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 27 III 1974)

Фитогормоны играют важную роль в индукции и стимуляции клеточных делений. Это не вызывает сомнений для цитокининов (¹, ², ³), но не является общепризнанным для ауксинов (⁴⁻⁷). При рассмотрении действия фитогормонов необходимо различать индукцию делений, т. е. включение в цикл дифференцированных, потерявших способность к делению клеток, и стимуляцию уже делящихся клеток, заключающуюся или в ускоренном прохождении клетками митотического цикла, или в стимуляции повторного включения их в митотический цикл. Данные по индукции клеточных делений в сердцевинной паренхиме стебля табака (⁸⁻¹¹), клубня топинамбура (¹², ¹³) доказывают необходимость присутствия в питательной среде двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов.

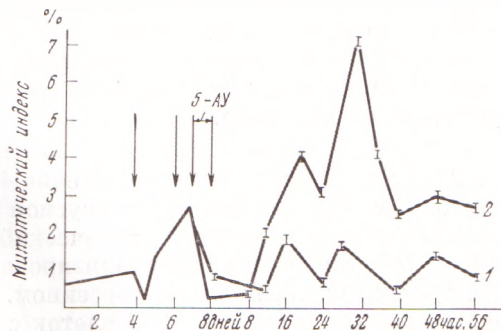


Рис. 1. Изменение митотического индекса в суспензионной культуре женьшеня после 24-часового воздействия 5-АУ. 1 — контроль, 2 — после обработки 5-АУ. Стрелками отмечены моменты смены среды

Большинство работ по стимуляции клеточных делений фитогормонами выполнено на сложных, в разной степени дифференцированных объектах: корневых меристемах (¹⁴, ¹⁵), стеблевых точках роста (¹⁶), растущих листьях (¹⁶). Существование противоречивых мнений о действии кинетина и ауксина в этом процессе обусловлено тем, что в случае активности только одного из экзогенных гормонов всегда можно предположить эндогенный ресурс второго и поэтому для изучения этого вопроса желательно иметь полностью гормонозависимую систему.

Большой интерес как модельные системы представляют культуры изолированных и пассируемых клеток, выращиваемые на сложной питательной среде и, как правило, нуждающиеся в экзогенном ауксине и цитокинине. Использование гормонозависимых культур изолированных клеток дает возможность определить место и роль каждого из гормонов в синтезах, обеспечивающих прохождение клетками митотического цикла. Так, осуществлена (¹⁷) частичная синхронизация клеточных делений суспензионной культуры табака временным исключением из среды цитокининов и ауксинов с последующим их внесением в среду после периода лаг-фазы. Авторы (¹⁷) не определяют точного места действия ауксина и цитокинина в клеточном цикле. Однако они полагают, что непосредственно синхронизи-

вирующий эффект обусловлен цитокининовым блоком. Ауксин же, по их мнению, влияет на скорость прохождения клетками митотического цикла. На штамме суспензионной культуры табака (¹⁸), не нуждающемся в присутствии кинетина в среде, была продемонстрирована необходимость ауксина для перехода клеток из G₁ в S-период. Внесение ауксина в среду после 4-дневного исключения приводило к частичной синхронизации деления клеток.

В данной работе была сделана попытка выяснить место цитокининового и ауксинового блока в митотическом цикле частично синхронизированной культуры клеток женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С. А. Меу).

Объектом исследования служила частично синхронизированная суспензионная культура клеток женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С. А. Меу). Ткань корневого происхождения выращивалась на среде Мурасиге и Скуга, модифицированной Писецкой (¹⁹), и пересаживалась каждые 3 недели. Для получения тканевой суспензии 10-дневную ткань с агаризированной среды переносили в жидкую питательную среду (¹⁹), где фитогормоны были представлены в следующих концентрациях: α-нафтилуксусная кислота 3 мг/л, кинетин 0,075 мг/л.

Культура выращивалась на роллере при скорости вращения 3 оборота в 1 мин. в плоскодонных круглых колбах емкостью 1 л. В колбы помещали по 5 г ткани на 100 мл среды. Выращивание проводили в термостатированных условиях при $t 26 \pm 1^\circ$ в темноте. После предварительной подготовки культуры, заключавшейся в нескольких повторных переносах на свежую среду (через 4 дня, 2 дня), ткань обрабатывали 6 мМ 5-аминоурацилом (5-АУ) в течение 24 час., трижды отмывали свежей питательной средой и переносили для дальнейшего культивирования на полную питательную среду. В вариантах с исключением фитогормонов ткань отмывали средой без ауксина и кинетина.

Пробы для анализа митотического индекса отбирали из одной колбы (по 2—3 мл) каждые 4 часа в течение 48—56 час. Материал фиксировали в смеси абсолютного спирта и уксусной кислоты (3:1) с последующим перенесением в 70% спирт. Митотический индекс (процент делящихся клеток от общего числа проанализированных) определяли на давленных препаратах, окрашенных ацеторсеином. В каждом образце анализировали не менее 5000 клеток по 1000 клеток с одного препарата. Учитывали все фазы митоза. Вычисляли среднее арифметическое и ошибку доли по формуле

муде
$$m = \pm \sqrt{\frac{\text{м.и.}(100 - \text{м.и.})}{n}}$$
, где m — ошибка доли, м.и. — митотический индекс, n — общее число проанализированных клеток.

По имеющимся в литературе сведениям 5-АУ блокирует синтез ДНК и аккумулирует клетки, способные к делению, в S-периоде митотического цикла (^{20, 21}). После снятия действия ингибитора создается возможность синхронного прохождения этими клетками митотического цикла (S+G₂+M) (рис. 1). В наших опытах после снятия действия 5-АУ (6 мМ) и инкубирования культуры на среде в присутствии фитогормонов было отмечено два пика синхронных митозов (рис. 1) через 20 час. (4,20%) и через 32 часа (7,30%). Наличие двух близких по времени максимумов синхронных делений можно отнести за счет гетерогенности клеточной популяции женьшеня по продолжительности G₂-периода.

В серии опытов после отмывки ингибитора культуру переносили на среду без ауксина и кинетина. Гормоны вносили в среду только через 4 часа после инкубации в среде без гормонов. В варианте с исключением ауксина и кинетина был отмечен четкий сдвиг пиков синхронных делений (рис. 2) на 4 часа по сравнению с контролем. Точное совпадение по времени сдвига синхронных делений указывает на то, что в отсутствие ауксина и кинетина клетки не способны к прохождению периодов митоти-

ческого цикла. Оставалось не ясным, что блокировало прохождение клетками цикла деления — отсутствие того или другого гормона или их комбинации. Для выяснения этого вопроса были проведены эксперименты с исключением либо одного ауксина, либо одного кинетина. Результаты опытов показали, что в отсутствие кинетина клетки, синхронизированные 5-АУ, не обнаруживаются в митозе. Характер кривой (отсутствие двух пиков синхронных делений) и ее низкий уровень (рис. 3) дает право предполагать, что в этом случае лишь одиночные клетки, возможно составляющие фонд непродлиферирующих клеток, способны к делению. Подобные результаты наблюдались Викторовой при облучении клеточной популяции культуры гапшлопауса (22).

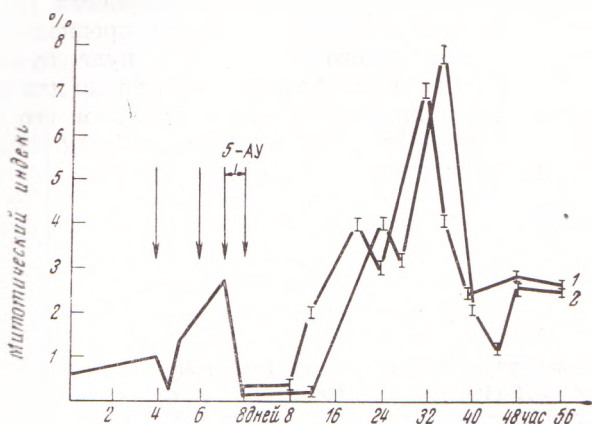


Рис. 2. Влияние совместного исключения из среды ауксина и кинетина на время вхождения в митоз частично синхронизированных клеток суспензионной культуры женьшеня. 1 — наличие в среде ауксина и кинетина в течение всего опыта, 2 — исключение ауксина и кинетина из среды на 4 часа после снятия действия 5-аминоурацила

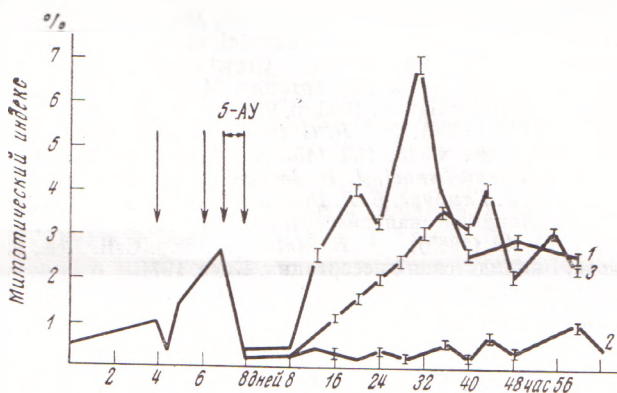


Рис. 3. Влияние исключения из среды одного ауксина и одного кинетина на время вхождения в митоз частично синхронизированных клеток суспензионной культуры женьшеня. 1 — наличие в среде ауксина и кинетина в течение всего опыта, 2 — исключение кинетина и 3 — исключение ауксина из среды после снятия действия 5-АУ

В варианте с кинетином на фоне исключения из среды ауксина (рис. 3) митотическая активность была несколько ниже, чем в контроле. Максимальное значение митотического индекса в этом случае не превышало 4%. На графике митотического индекса в варианте с исключением из среды ауксина были отмечены те же два пика синхронных митозов, но наблюдались они на 16 час. позже, чем в контроле. Очевидно, в отсутствие ауксина клетки женьшеня способны продвигаться по митотическому циклу, но замедленно.

Результаты экспериментов показали, что обязательным условием нормального прохождения первого митотического цикла клетками суспензии женьшеня, синхронизированными 5-АУ, является присутствие в среде фитогормонов ауксина и кинетина. В отсутствие кинетина клетки, синхронизированные 5-АУ, не обнаруживались в митозе, что вполне согласуется с имеющимися в литературе данными о необходимости присутствия имен-

но кинетина для прохождения поздних периодов интерфазы, карокинеза и цитокинеза (¹, ⁹, ¹⁴).

Сохранение клетками синхронизированной суспензии женьшеня способности, хотя и замедленно, продвигаться по митотическому циклу и вступать в митоз в отсутствие ауксина можно объяснить разными способами. Во-первых, клетки могут быть заблокированы 5-АУ на стадии, в которой все процессы, стимулирующиеся ауксином, уже закончены (синтез нуклеиновых кислот и белков G₁- и раннего S-периодов). Тогда для дальнейшего продвижения клеток по циклу необходимо присутствие только кинетина. При таком объяснении, однако, остается мало понятным замедление прохождения клетками цикла в отсутствие ауксина, если не предполагать какую-то иную роль ауксина на поздних периодах цикла. Возможно, в нашем случае вопрос решается проще. Можно предположить существование небольшого субоптимального эндогенного пула ауксина в клетках женьшеня. Количество эндогенного ауксина достаточно для инициации процесса, но не оптимально для обеспечения нормальной его скорости. Ответ на эти вопросы может быть получен в дальнейших опытах с синхронизированной популяцией клеток женьшеня.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
5 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. H. Haber, H. J. Luippold, *Plant Physiol.*, v. 35, 486 (1960). ² D. E. Fosket, J. G. Torrey, *Plant Physiol.*, v. 44, 871 (1969). ³ H. E. Street, H. A. Collin et al., In: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, Ottawa, 1968, p. 489. ⁴ A. H. Haber, *Plant Physiol.*, v. 37, 18 (1962). ⁵ A. MacManus, *Nature*, v. 185, № 4705, 44 (1960). ⁶ P. E. Pilet, *Les phytohormones de croissance*, Masson, Paris, 1961. ⁷ L. Duhamet, 1945, цит. по P. E. Pilet, 1961, p. 648. ⁸ F. Skoog, C. O. Miller, In: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, № 11 (1957). ⁹ D. N. Das, K. Patau, F. Skoog, *Physiol. plant.*, v. 9, 640 (1956). ¹⁰ J. P. Nitsch, In: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, Ottawa, 1968, p. 563. ¹¹ Н. Н. Дмитриева, Кандидатская диссертация, М., 1972. ¹² G. Seiterfield, In: *Symp. Soc. Exp. Biol. Cell. Differentiation*, 1963, p. 98. ¹³ M. M. Yeoman, P. K. Evans, G. G. Maik, *Nature*, v. 209, 1115 (1966). ¹⁴ R. Guttman, *Chromosoma*, v. 8, 341 (1956). ¹⁵ G. Olzewska, *Exp. Cell. Res.*, v. 16, 193 (1959). ¹⁶ M. Catarino, *Portug. acta biol.*, v. 9, 211 (1965). ¹⁷ C. Péaud-Lenoel, J. P. Jounneau, In: *Les cultures de Tissue de Plantes*, 1971, p. 95. ¹⁸ К. З. Гамбург, Е. Р. Высоцкая, *Цитология*, т. 13, № 9, 1140 (1971). ¹⁹ Н. Ф. Пусецкая, Кандидатская диссертация, М., 1971. ²⁰ W. Prenskey, H. H. Smith, *J. Cell Biol.*, v. 24, 40 (1965). ²¹ E. Mattingly, *Exp. Cell. Res.*, v. 42, 274 (1966). ²² Н. В. Викторова, Кандидатская диссертация, Киев, 1971.