

УДК 581.143.5'6:631.811.98

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОГЕННЫХ АУКСИНОВ В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕХОДА ДЛИТЕЛЬНО ПАССИРУЕМОЙ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ТАБАКА К ГОРМОННЕЗАВИСИМОСТИ

Г.М. АРТАМОНОВА, Т.Д.П. ХАМАНГОДА

(Кафедра биотехнологии)

Методом иммуноферментного анализа определяли динамику содержания эндогенных ауксинов в каллусных тканях табака сорта Wisconsin 38 при длительном пассировании. Каллусную ткань выращивали на питательной среде МС с ИУК и кинетином (среда А), а также с 2,4-Д и кинетином (среда В). Через 9 мес на среде А и через 7 мес на среде В каллусная ткань становилась гормоннезависимой. Процесс дедифференцировки и каллусообразования характеризовался резким снижением содержания эндогенных ауксинов в клетках. В дальнейшем содержание гормона в каллусных тканях плавно увеличивалось, однако к моменту возникновения гормоннезависимости не достигло исходной величины. Предполагается, что наиболее значительные изменения в жизни клетки происходят при ее дедифференцировке и превращении в каллусную, а переход к «привыканию» является постепенным нарастанием этого процесса и наиболее логичным его завершением.

Одним из наиболее интересных и в то же время недостаточно изученных вопросов клеточной селекции является вопрос о возникновении гормоннезависимости (так назы-

ваемого «привыкания») в процессе длительного пассирования культивируемых каллусных тканей.

Поскольку для отбора клеток при работах по клеточной селекции ис-

пользуют длительно пассируемые ткани, обладающие наибольшим генетическим разнообразием, нельзя не учитывать способности некоторых культур к «привыканию».

Процесс «привыкания» носит, по-видимому, общебиологический характер. Во многом он сходен с явлением, именуемым в онкологии «прогрессией» опухолевого роста. Согласно концепции Фулдса [11], прогрессия рассматривается как развитие опухоли путем необратимых качественных изменений ее признаков, приводящих к нарастанию злокачественности. Как и в случае перехода каллусной клетки к гормонезависимому, по существу опухолевому росту, превращение нормальной клетки в опухолевую и дальнейшая ее прогрессия связаны с нарастающей дедифференцировкой клеток. Примером прогрессии опухолевого роста может служить превращение доброкачественных опухолей в злокачественные. Многие гормонезависимые опухоли на определенном этапе своего развития становятся гормонезависимыми [2].

Для каллусных клеток возникновение гормонезависимости некоторые авторы связывают с приобретением способности к синтезу собственных гормонов [8, 9, 14]. В корончатогалловых опухолях содержание ауксина значительно превышает их уровень в исходном эксплантате [10]. Ченг установил, что переход тканей межвидовых гибридов табака к автономному опухолевому росту сопровождается индукцией под влиянием ауксина ферментативной активности синтеза ИУК [9]. Однако способностью к синтезу эндогенных гормонов обла-

дают не только гормонезависимые, но и нормальные культивируемые клетки, хотя и в меньшей степени [6]. В опытах, проведенных Леоновым и Гамбургом, сделана попытка установить корреляцию между гормонезависимым от ауксина ростом каллусной ткани и потенциальной активностью синтеза ИУК. Для этого были использованы разные растительные ткани, в том числе нормальные и автономные ткани табака. Однако корреляцию между этими двумя факторами установить не удалось [5].

Ряд авторов изучали изменение содержания эндогенных ауксинов в культивируемых тканях в течение первого месяца после высадки эксплантата на питательную среду. Результаты опытов показали, что вначале содержание эндогенной ИУК в тканях табака снижается, затем начинает увеличиваться, а после 24-го дня снова уменьшается [7, 10, 12].

Приведенные результаты позволяют проследить динамику содержания эндогенных ауксинов в течение большей части онтогенеза нормальной каллусной клетки и охватывают очень небольшой промежуток времени. Однако нет данных относительно изменений содержания ауксинов в течение повторных пассирований каллусной ткани, приводящих в дальнейшем к усилению дедифференцировки клеток и превращению их в гормонезависимые. Поэтому в задачу настоящей работы входило проследить динамику содержания эндогенной ИУК в процессе перехода нормальной каллусной клетки к «привыканию» и гормонезависимому росту.

Методика

В качестве эксплантатов использовали основания листьев одномесячных растений табака сорта Wisconsin 38. Их стерилизовали в 0,1 % растворе сулемы и культивировали на питательных средах следующего состава.

1. Среда А: минеральные соли и витамины по Мурасиге и Скугу, ИУК и кинетина по 0,2 мг/л.

2. Среда В: минеральные соли и витамины по Мурасиге и Скугу, 2,4-Д и кинетин соответственно 2 и 0,2 мг/л.

Полученный на каждой из этих сред каллус разделяли на 3 части, первую из которых пассировали на свежую питательную среду того же

состава для дальнейшего культивирования, вторую переносили на безгормональную питательную среду МС для выявления способности к автономному росту, третью использовали для иммуоферментного анализа гормонов. При экстракции ауксинов и иммуоферментном анализе применяли методику Кудояровой [4].

Опыты проводили в 10 биологических и 4 аналитических повторностях.

Результаты и их обсуждение

Результаты определений показали, что процесс дедифференцировки и каллусообразования у табака характеризуется очень резким снижением содержания эндогенных

Динамика содержания эндогенного ауксина (нг на 1 г сырой массы) при длительном культивировании

Среда	Время культивирования, мес									
	0 эксп- лантат	1	2	3	4	5	6	7	8	9
А	2828,6 ±25,0	58,7 ±5,4	88,2 ±4,1	157,7 ±10,2	195,0 ±11,1	226,0 ±9,1	250,6 ±15,6	297,4 ±13,1	334,1 ±10,1	376,1 ±14,1
В	2828,6 ±25,0	172,7 ±10,2	224,0 ±14,2	269,4 ±15,1	317,4 ±16,1	346,7 ±11,1	457,8 ±10,1	592,9 ±13,1		

ауксинов в клетках. Уже через месяц начала культивирования содержание ИУК в клетках снизилось примерно в 47 раз на среде А и в 16 раз на среде В (таблица).

В дальнейшем содержание гормона в каллусных тканях постепенно увеличивалось, вероятно, за счет синтеза собственного ауксина. Через 7 мес количество ИУК в каллусе на среде А возросло примерно в 5

раз, а на среде В — в 3,5 раза, причем на ней к этому времени завершился процесс «привыкания» и каллусная ткань приобрела способность к автономному росту. На поверхности каллуса появились отчетливо видные светлые зоны пролиферирующих клеток. В дальнейшем масса каллусной ткани заметно увеличивалась. На среде А, которая в качестве ауксина содержала ИУК, про-

цесс «привыкания» и перехода к гормоннезависимому росту завершился через 9 мес. При этом содержание эндогенных ауксинов в тканях увеличилось по сравнению с первым месяцем культивирования примерно в 5 раз. Однако даже с возникновением способности к гормоннезависимому росту ни на одной из питательных сред в «привыкших» тканях не восстанавливался исходный уровень ИУК. На среде А «привыкание» наблюдалось при уровне эндогенной ИУК в тканях примерно в 7,5, а на среде В — в 4,7 раза более низком, чем в эксплантате.

По мнению Бутенко [1], ауксиннезависимые культуры неопухолевого происхождения имеют минимальный оптимум, необходимый для деления и роста клеток, а синтез эндогенного ауксина в ауксинзависимых клеточных культурах происходит в субоптимальных для этих целей количествах. Опухолевые же клетки являются сверхпродуцентами гормонов.

Интересно, что для перехода клеток эксплантата к каллусообразованию требуются количества ауксинов, значительно превышающие их содержание в исходном материале. По-видимому, главную роль в ответной реакции клеток на содержание эндогенных и экзогенных ауксинов играет степень их дифференцировки. Наиболее ответственным этапом является переход дифференцированных клеток эксплантата к дедифференцировке и каллусообразованию. На этот процесс затрачиваются большие количества ауксинов. В пользу высказанной мысли говорят и полученные нами данные, согласно которым в каллусных тканях табака на среде с 2,4-Д (среда В)

наблюдались менее значительные изменения содержания эндогенных ауксинов, чем на среде с ИУК, но вместе с тем 2,4-Д вызывает более интенсивное каллусообразование и быстрый переход к «привыканию». Вероятно, это связано с более активным дедифференцирующим действием 2,4-Д по сравнению с ИУК и усилением дедифференцировки клеток.

Скорее всего после перехода клетки в дедифференцированное состояние и приобретения способности к делению ей в дальнейшем требуются гораздо меньшие количества гормонов для поддержания этого состояния. Поэтому сравнительно небольшие количества эндогенного ауксина и способны обеспечить рост и деление клеток в «привыкших» тканях.

Существует 3 основных пути, по которым может пойти развитие клетки после ее дедифференцировки и превращения в каллусную. Первый путь — это вторичная дифференцировка и морфогенез; второй — снижение или полная утрата способности к морфогенезу, нарастание дедифференцировки, по сути ее «прогрессия», заканчивающаяся переходом к «привыканию» и приобретением способности расти на безгормональной среде; и, наконец, третий путь — нормальный онтогенез каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием.

Длительное культивирование каллусных тканей в пересадочной культуре, при котором клетки постоянно испытывают действие ауксинов, поддерживающих их в дедифференцированном состоянии, может приводить их к развитию по пути про-

грессии дедифференцировки, завершающейся гормональной автономией.

Большой интерес представляло выяснение вопроса о том, какой характер носит переход ауксинзависимых каллусных клеток к гормоннезависимым: революционный, скачкообразный или плавный эволюционный. Полученные результаты по динамике содержания эндогенной ИУК в процессе перехода каллусной клетки к привыканию позволяют прийти к заключению, что революционный характер носят скорее всего дедифференцировка клетки и превращение ее в каллусную, переход же каллусной клетки к гормоннезависимости и стойкой дедифференцировке является лишь постепенным нарастанием этого процесса и наиболее логичным его завершением.

Выводы

1. Возникновение гормоннезависимости в пересадочной каллусной культуре табака наблюдалось на среде с 2,4-Д через 7 мес, а на среде с ИУК — через 9 мес культивирования.

2. Содержание эндогенных ауксинов в культивируемых клетках табака резко снижалось при переходе к каллусному росту, после чего начинало плавно увеличиваться, однако к моменту возникновения гормоннезависимости не достигало исходного уровня.

3. Переход к автономному росту происходил при увеличении содержания эндогенных ауксинов примерно в 4—5 раз по сравнению с началом каллусообразования. При этом их содержание не достигало исходного уровня в эксплантате.

4. В работе установлены границы содержания эндогенной ИУК, в пределах которых растет каллусная ткань и за пределами которых возможен переход к автономному росту.

5. Процесс перехода к «привыканию» в каллусных клетках табака на среде с 2,4-Д завершался быстрее, чем на среде с ИУК, и при менее выраженных изменениях в содержании эндогенных ауксинов, что, вероятно, связано с более сильной дедифференцирующей активностью 2,4-Д по сравнению с ИУК.

6. Переход каллусной клетки к «привыканию» и связанной с ней гормоннезависимостью происходит не скачкообразно, а постепенно и может рассматриваться как прогрессия неорганизованного роста растительных клеток.

7. Наиболее значительные изменения в жизни клетки происходят при ее дедифференцировке и превращении в каллусную. Переход же каллусной клетки к «привыканию» является постепенным нарастанием этого процесса и наиболее логичным его завершением.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бутенко Р.Г.* Гормоннезависимость культивируемых клеток растений как модель для изучения гормональной регуляции.— В кн.: Фитогормональная регуляция роста и развития растений. Киев: Изд. АН УССР, 1985.— 2. *Васильев Ю.М.* Основные биологические особенности раковой клетки.— В кн.: Биология злокачественного роста. М.: Наука, 1965.— 3. *Катаева Н.В.* Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых побегах.— Физиол. раст.,

1990, т. 37, вып. 4, с. 813—821.—
4. *Кудоярова Г.Р.* Методические аспекты иммуноферментного анализа фитогормонов.— В кн.: Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений, применение в физиологии растений и экологии. Уфа: Ин-т биол. АН СССР, 1990.—
5. *Леонова Л.А., Гамбург К.З.* Синтез ИУК в нормальных и автономных культурах растительных тканей.— Физиол. раст., 1975, т. 22, вып. 6, с. 1213—1217.—
6. *Рекославская Н.И., Гамбург К.З. и др.* Динамика содержания триптофана и индолуксусной кислоты в культивируемых клетках.— Физиол. и биохим. культ. раст., 1986, т. 18, № 2, с. 162—166.—
7. *Рекославская Н.И., Клоба В.И. и др.* К вопросу о соотношении содержания триптофана и индолуксусной кислоты эндогенного происхождения в аукси-

нозависимой ткани табака.— В кн.: Оперативные информационные материалы. Иркутск: Сиб. ин-т физиол. и биохим раст. СО АН СССР, 1985, с. 3—6.—
8. *Beiderbeck R.*— Pflanzentumoren. Verlage eugen ulmer. Stuttgart, 1977.—
9. *Cheng T.J.*— Plant physiology, 1972, vol. 50, p. 723—727.—
10. *El-bahr M.K., Kutacek M.*— Biochem. physiol. pflanzen., 1984, vol. 179, p. 739—748.—
11. *Foulds L.*— Cancer Res., 1954, vol. 14, p. 327—334.—
12. *Moloney M. M., Malcolm C.*— Elliott. Planta, 1982, vol. 156, № 4, p. 326—331.—
13. *Murashige T., Skoog F.* Physiol. Plantarum, 1962, vol. 15, № 3, p. 473—497.—
14. *Schell J.S., Kahl G.* Molecular biology of plant tumors. Academic press., N. Y., 1982.

*Статья поступила 20 марта
1994 г.*

SUMMARY

Dynamics of endogenous level of auxins in tobacco callus (v. Wisconsin 38) during a long-term passage was studied by ELISA. Two M-S culture mediums with IAA and kinetin (medium A), 2,4-D and kinetin (medium B) were used for callus culture. Callus cultures were converted into habituated callus cultures in medium A within 9 months and in medium B within 7 months. At the earlier stage of callus induction the auxin level has gone down fast. Later it was smoothly increasing, but by the moment of habituation endogenous auxin level was not as high as the auxin level in explants. The results suggest that the most important changes in cell life may occur at the stage of callus induction, and the beginning of habituation is gradual intensification of this process and its logical end.