

С. А. РЕЗНИКОВА, В. О. ОСТРОВЕРХОВ

ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ПРОЦЕССЕ МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У *LILIUM CANDIDUM* L.

(Представлено академиком Б. А. Астауровым 28 XI 1969)

В последние годы выполнен ряд исследований, касающихся физиологии пыльника покрытосеменных растений (¹), однако количественные закономерности при формировании и функционировании его отдельных специализированных тканей выяснены пока еще недостаточно полно.

Определение содержания ДНК в развивающихся микроспороцитах представляет интерес в связи с установлением причин, обуславливающих переход соматически делящихся клеток к мейозу, для выяснения специфики редукционного деления, а также для изучения механизма физиологической специализации генеративных клеток.

Редупликация ДНК и удвоение хромосом являются центральными процессами, протекающими в интерфазе при подготовке к клеточному делению. Для решения вопроса о точном времени синтеза ДНК и репродукции хромосом в процессе деления широко используются цитофотометрия клеточных ядер, окрашенных по Фельгену, и автордиографическое исследование ядер после введения в них меченых предшественников ДНК и ядерных белков. При помощи этих методов установлено, что в делящихся клетках соматических тканей количество ДНК в ядрах удваивается в интерфазе до видимого вступления хромосом в профазу. Ранние профазные ядра содержат в два раза больше ДНК, чем ядра в поздней телофазе (^{2, 3}).

Характеризуя особенности мейоза и отличая его от митоза, Дарлингтон (⁴) постулировал одинарность хромосом в лептонеме, считая это принципиальным отличием профазы мейоза. Однако в настоящее время большинство цитологов считает лептонеменные нити двойными. Проведенные исследования с использованием цитофотометрических и автордиографических методов показали, что увеличение ДНК и редупликация хромосом имеют место до зигонемы и что хромосомы, следовательно, конъюгируют, когда каждая из них уже состоит из двух хроматид (⁵⁻⁷). В некоторых работах проводится сравнение содержания ДНК в ядрах развивающихся микроспороцитов и в ядрах тапетума и париетальных слоев стенки пыльника (^{7, 8}).

Мы использовали цитофотометрию окрашенных по Фельгену ядер для изучения биосинтеза ДНК в микроспороцитах *L. candidum* L. Пыльники на разных этапах развития спорогенной ткани фиксировали по Карнуа и проводили в парафине. При реакции Фельгена оптимальное время гидролиза срезов составляло 6 мин. Бутоны для фиксации пыльников брали из одного и того же места на соцветии, с одинаковых по развитию специально подобранных растений. Благодаря этому сроки фиксации примерно соответствуют естественному темпу развития.

Содержание ДНК в ядрах определялось при помощи многоволновой цитофотометрии (⁹). Измерения проводили микрофотометрической приставкой ФМЭ-1. С целью повышения точности измерений блоки питания и усиления были заменены более стабильными приборами. Для питания фотоумножителя использовали стабилизированный выпрямитель ВС-22. Сигналы фотоумножителя регистрировались без усиления зеркальным гальванометром М-195, чувствительностью $1,10^{-8}$ а. Лампа осветителя микроскопа питалась от аккумулятора. Каждое ядро фотометрировали в трех длинах волн: 481, 556 и 590 мμ.

Размер ядра определяли при помощи окуляр-микрометра. Поскольку ядра по форме приближались к эллипсоиду вращения, случайно ориенти-

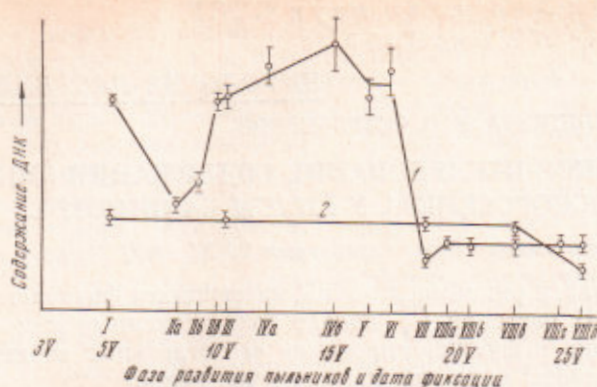


Рис. 1. Содержание ДНК в ядрах клеток пыльников *L. candidum* L. в ходе микроспорогенеза. 1 — генеративные клетки, 2 — клетки среднего слоя; I a — e — спорогенная ткань, II — микроспороциты в интерфазе, III — пролептонема, IV a — б — лептонема, V — пахинема, VI — диплонема, VII — молодые тетрады, VIII a — д — одноклеточная пыльца

чем клетки спорогенной ткани. В это время содержание ДНК в ядрах микроспороцитов примерно такое же, как в ядрах клеток среднего слоя стенки пыльника. Почти полное отсутствие митозов в клетках промежуточного слоя, по-видимому, свидетельствует о том, что подавляющее большинство их находится в гетеросинтетической стадии, а содержание ДНК соответствует диплоидному набору.

В ядрах микроспороцитов в интерфазе содержание ДНК удваивается и к началу профазы I соответствует содержанию ДНК в ядрах спорогенной ткани. Показатели фотометрирования различных стадий профазы I неоднородны, достоверно увеличиваясь в лептонеме. Ядра молодых тетрад содержат в четыре раза меньше ДНК, чем микроспороциты в постсинтетической фазе. В дальнейшем в процессе созревания микроспор содержание ДНК в них несколько увеличивается.

Изменение объема ядер микроспороцитов в процессе формирования микроспор показано на рис. 2 и 3. Ядра спорогенной ткани значительно в 2,5—3 раза, крупнее ядер клеток среднего слоя. В последующих фазах микроспорогенеза объем ядер сильно увеличивается и достигает максимума в конце профазы I. При этом наибольшее увеличение объема наблюдается уже после завершения удвоения ДНК. Объем одного ядра тетрады снижается до уровня ядер среднего слоя. Это снижение настолько сильно, что суммарный объем четырех ядер тетрады значительно меньше объема ядра микроспороцита в пресинтетической стадии интерфазы. В процессе созревания пыльцевых зерен объем ядра снова увеличивается и в зрелой одноклеточной пыльце примерно в четыре раза превосходит объем ядер клеток среднего слоя.

Полученные нами данные в общих чертах соответствуют современным представлениям о редупликации генетического материала в процессе микроспорогенеза. Содержание ДНК соответствует числу геномов, а удвоение ее осуществляется в премейотической интерфазе (^{5, 7}).

Необходимо дальнейшее исследование причины отмеченного повышения интенсивности реакции Фельгена на стадии лептонемы, которое может быть вызвано не увеличением содержания ДНК, а существенным изменением состояния дезоксирибонуклеопротеида в процессе микроспорогенеза.

Известны две причины изменения объема ядер: кратное в связи с изменением плоидности и функциональное. Функциональное увеличение объема ядер не связано с увеличением числа или массы хромосом или из-

роvanному к оптической оси микроскопа, их объем вычисляли по формуле: $v = \frac{4}{3}\pi l k (l + k) / 2$, (l — длинная, а k — короткая полуоси ядра (¹⁰)).

Достоверность полученных данных определяли дисперсионным анализом и вычислением доверительных интервалов на 95%-м уровне значимости.

Динамика содержания ДНК в процессе микроспорогенеза показана на рис. 1. Только что сформировавшиеся материнские клетки пыльцы содержат в ядрах в два раза меньше ДНК,

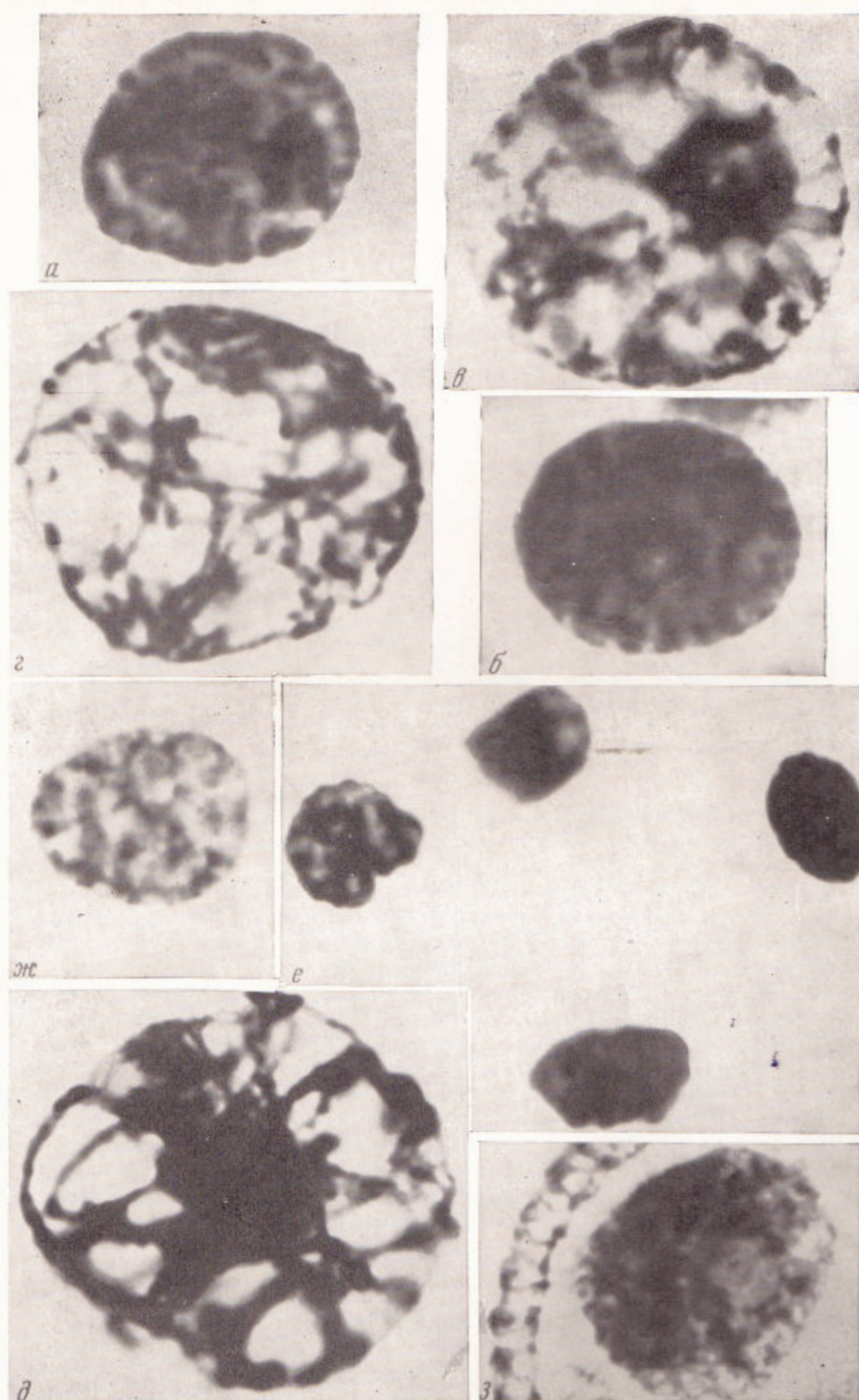


Рис. 3. Ядра клеток спорогенной ткани *L. candidum* L. в ходе микроспорогенеза. а — спорогенная ткань в начале митозов, б — она же в конце митозов, в — микроспороциты в интерфазе, г — лептонема, д — зигонема, е — тетрады, ж — молодая одноклеточная пыльца, з — зрелая одноклеточная пыльца. 1575 X

менением количества ДНК и происходит за счет увеличения РНК и не связанного с ДНК белка, а также воды и солей. Оно рассматривается в качестве критерия усиленной жизнедеятельности клетки^(10, 11).

На изменение объема ядер в процессе развития спорогенной ткани пыльника *L. candidum* L. влияют обе причины. Синтез ДНК в микроспороцитах сопровождается адекватным увеличением объема ядер, а редукция хромосомного набора — уменьшением их в одноклеточной пыльце.

Наряду с этим, наблюдаются значительные изменения объема ядер, не связанное с изменением их плоидности или содержания ДНК. На всем протяжении разви-

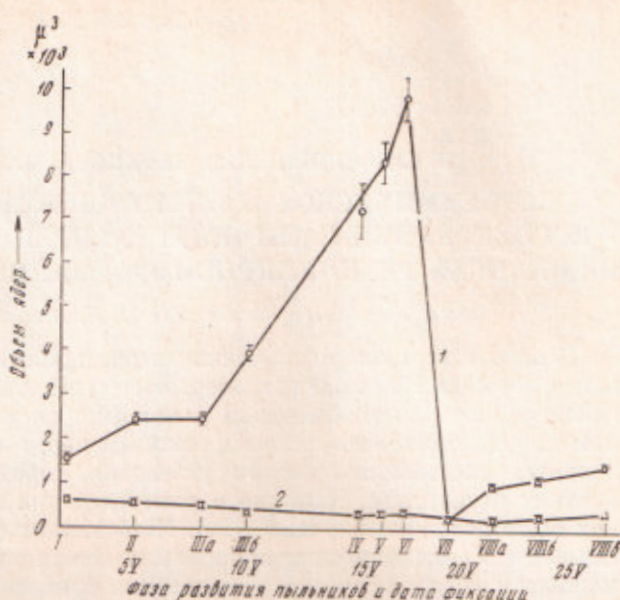


Рис. 2. Объем ядер клеток пыльников *L. candidum* L. в ходе микроспорогенеза. 1 — генеративные клетки, 2 — клетки среднего слоя; I — спорогенная ткань в начале митозов, II — спорогенная ткань в конце митозов, III а — б — микроспороциты в интерфазе, IV — лептонема, V — зигонема, VI — пахинема, VII — молодые тетрады, VIII а — в — одноклеточная пыльца

тия от спорогенной ткани до конца профазы I объем ядер сильно увеличивается. В этот период каждая последующая генерация клеток в сравнении с предыдущей имеет больший объем интерфазных ядер при постоянном уровне плоидности. Аналогичное увеличение объема ядер, хотя и в меньшем масштабе, происходит при созревании микроспор.

Столь значительное функциональное увеличение объема ядер спорогенной ткани пыльника отражает, на наш взгляд, роль ядра в тех глубоких физиологических изменениях, которые осуществляются в процессе специализации микроспор. Особенно сильно эти изменения выражены при подготовке клеток к мейозу. В пыльнике сконцентрированы ткани разной специализации, а развитие спорогенных клеток проходит в тесном взаимодействии с окружающими тканями. Поэтому пыльник является удачным объектом, позволяющим исследовать роль внутриклеточных процессов и процессов тканевого взаимодействия в дифференциации клеток.

Дальнейшее изучение физиологии пыльника будет способствовать выяснению механизмов развития и специализации генеративных клеток.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
эфиромасличных культур

Поступило
25 XI 1969

Крымский сельскохозяйственный институт

им. М. И. Калинина

Симферополь

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. F. Linskens, Ann. Rev. Pl. Physiol., 15, 255 (1965).
- ² A. Howard, S. R. Pelk, Exp. Cell Res., 2, 178 (1951).
- ³ H. Swift, Rev. Cytol., 2, 1 (1953).
- ⁴ C. D. Darlington, Recent Advances in Cytology, London, 1937.
- ⁵ I. H. Taylor, Exp. Cell Res., 4, 164 (1953).
- ⁶ M. I. Moses, I. H. Taylor, Exp. Cell Res., 9, 474 (1955).
- ⁷ W. S. Plaut, Hereditas, 39, 439 (1953).
- ⁸ F. Schrader, C. Leuchtenberger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 36, 643 (1949).
- ⁹ А. И. Шерудило, В. Я. Бродский, Оптика и спектроскопия, 2, 266 (1961).
- ¹⁰ Я. Е. Хесип, Размеры ядер и функциональное состояние клетки, М., 1967.
- ¹¹ И. А. Алов, А. И. Брауде, М. Е. Асиз, Основы функциональной морфологии клетки, М.—Прага, 1969.