

УДК 581.14(047)

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Н. П. АКСЕНОВА, Т. В. БАВРИНА, Т. Н. КОНСТАНТИНОВА,
С. А. ГОЛЯНОВСКАЯ, М. Б. СОЛОВЬЕВА

ДИНАМИКА ДНК, РНК И БЕЛКОВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР У МАРИ И ГОРЧИЦЫ ВО ВРЕМЯ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИИ ЦВЕТЕНИЯ

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 14 VIII 1972)

У длиннодневного вида *Sinapis alba* и короткодневного вида *Chenopodium amaranticolor* в процессе фотопериодической индукции цветения определяли содержание ДНК и РНК в ткани целых верхушек и содержание ДНК, РНК и белка в клеточных ядрах, выделенных из верхушек растений.

Растения выращивали при температуре 20° и освещении лампами ЛБ-30 с интенсивностью 15 тыс. лк и относительной влажности воздуха 75%. Длинный день составлял 18 час., короткий 10 час. света в сутки. В течение месяца от посева растения выращивали на неблагоприятной для цветения длине дня, затем делили на две группы. Одну группу оставляли на неблагоприятной длине дня (вегетативный контроль), вторую переводили в условия фотопериода, благоприятного для цветения. Длительность индукции цветения у обоих объектов составляет 3–6 дней. На 9–11 день воздействия индуктивным фотопериодом появляются визуально заметные зачатки соцветий.

Для анализов использовали верхушечные стеблевые почки, включая апикальную и субапикальную зоны стеблевой меристемы с несколькими листовыми примордиями.

Выделение и очистку клеточных ядер проводили различными способами для мари и горчицы. Ядра мари изолировали из 3–4 г верхушек, которые гомогенизировали в среде с конечной концентрацией сахарозы 0,75 мол/л, 0,05М трис-НСl pH 7,6 и 0,003М CaCl₂. Клеточные ядра осаждали в пределах от 75 до 300g при 10-минутном центрифугировании. Осадок промывали в той же среде, повторно осаждали и вновь гомогенизировали в 5 мл среды того же состава. Суспензию наслаивали над 1,7М сахарозой и центрифугировали. Операцию повторяли дважды. В осадке получали фракцию, обогащенную клеточными ядрами, которую гомогенизировали в 30-кратном объеме 0,14М NaCl и осаждали центрифугированием. Процедуру повторяли 7 раз.

Гомогенизацию верхушек горчицы проводили в среде ⁽¹⁾, содержащей 50% водный глицерин, 0,01 М трис-НСl pH 7,8 и 0,003 М CaCl₂. Ядра осаждали в пределах 135g — 1500g. Осадок чистили повторным центрифугированием в среде выделения, двукратным центрифугированием через слой 1,7 М сахарозы и затем промывали 1 раз солевым версеном и 5 раз 0,14 М NaCl.

Чистоту фракции клеточных ядер мари и горчицы контролировали под микроскопами МБИ-3 и МБИ-6 (увел. 15 × 90) в капле суспензии после фиксации 70% этанолом и окрашивания метилгрюн-пиронином.

Из промытого ядерного материала для мари и горчицы извлекали две фракции. Фракцию I извлекали двукратной экстракцией 2М NaCl, после чего из остатка извлекали фракцию II двукратной экстракцией 0,05 М NaOH. В I и II фракции определяли содержание белка по Лоурн ⁽²⁾ и

содержание ДНК и РНК как и для целых верхушек ⁽³⁾ спектрофотометрически после очистки и разделения по Гвин рассчитывали по методу Спирина ⁽⁴⁾.

Примененная схема фракционирования ядер является одной из наиболее распространенных и используется для животных и растительных объектов ⁽⁵⁻⁷⁾. При этом считается ⁽⁸⁻¹⁰⁾, что 0,14M NaCl извлекает наряду с белками и РНК цитоплазматических примесей большую часть РНП «ядерного сока», а иногда также часть ДНП. 2M NaCl экстрагирует основную массу ДНП, включая ДНК хромосом, гистоновые и негистоновые белки, связанные с ДНК, а также часть РНП ядра. Щелочная

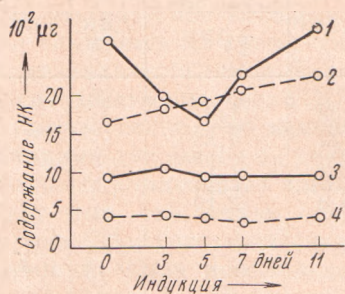


Рис. 1

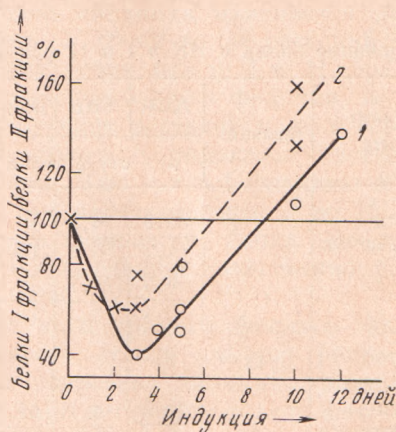


Рис. 2

Рис. 1. Содержание ДНК и РНК ($\mu\text{г/г}$ сырого веса) в верхушках мари и горчицы во время фотопериодической индукции цветения. 1, 2 — РНК; 3, 4 — ДНК; 1, 3 — мари, 2, 4 — горчица

Рис. 2. Изменение отношения белки I фракции/белки II фракции в процессе фотопериодической индукции цветения. 1 — мари, 2 — горчица. За 100% принято соотношение у вегетативного контроля

экстракция извлекает из остатка кислые белки и большую часть РНП ядрышка. Мы применяли сокращенную схему и не анализировали белки и РНК «ядерного сока», а также фракцию, оставшуюся в осадке после извлечения I и II фракции солью и щелочью.

У обоих видов растений содержание ДНК на единицу веса ткани практически не меняется в процессе индукции. В отличие от этого содержание РНК изменяется параллельно активности как ростовых, так и формообразовательных процессов. У длиннодневного вида горчицы воздействие длинным днем приводит к активации роста стебля, формообразованию и росту соцветий. Соответственно в верхушках горчицы наблюдается равномерное парастание содержания РНК в условиях длинного дня. У короткодневного растения мари воздействие благоприятным для развития коротким днем приводит к торможению роста стебля. Это отражается и на содержании РНК, которое заметно снижается в первые 5 дней индукции. Вслед за инициацией цветения у мари начинается активная дифференциация и рост соцветий, в связи с чем в ткани верхушек вновь увеличивается концентрация РНК (рис. 1).

Для целого ряда растений показано, что первым результатом индукции цветения является активация синтеза ДНК и РНК в клетках небольшой центральной зоны апекса. Позднее, с началом заложения и роста соцветий, усиление синтеза НК охватывает более обширные участки стеблевой меристемы ⁽¹¹⁻¹³⁾. Данные, представленные на рис. 1, отражают именно эти более поздние процессы, так как ранние изменения метаболизма НК в центральной зоне маскируются при учете суммарного содержания ДНК и РНК в гетерогенной ткани целых верхушек.

Таблица 1

Содержание НК в ядерном материале, полученном из 1 г верхушек
(мг/г сырого веса ткани)

Объект	ДНК		РНК		РНК/ДНК		НК в ядрах (в % от НК ткани)	
	ткань	ядра	ткань	ядра	ткань	ядра	ДНК	РНК
Горчица	399	38,3	2060	32,4	5,17	0,85	9,6	1,5
Марь	943	17,3	2318	12,7	2,46	0,73	1,8	0,5

Таблица 2

Содержание белка и НК в I и II фракциях клеточных ядер у горчицы и мари *

Вариант опыта	Фракция	ДНК	РНК	Белок	РНК/ДНК	Белок/РНК + ДНК	ДНК	РНК	Белок
		мг/г сырой ткани							
Вегетативные почки	I	30,9	18,3	48,6	0,59	1,0	—	—	—
		14,7	3,2	15,7	0,22	0,88			
	II	6,9	23,7	36,0	3,43	1,1	—	—	—
		0,4	8,3	19,1	20,8	2,19			
	I/II ^{а,б}	—	—	—	—	—	5,6 36,8	0,77 0,38	1,35 0,82
Индукция цветения	I	25,5	10,1	67,6	0,40	1,9	—	—	—
		11,4	1,9	5,6	0,17	0,42			
	II	13,2	24,0	67,0	1,81	1,8	—	—	—
		4,0	8,9	17,5	2,23	1,35			
	I/II ^{а,б}	—	—	—	—	—	1,9 2,8	0,42 0,21	1,01 0,32
Дифференциация соцветий	I	28,4	4,6	81,2	0,16	2,46	—	—	—
		16,6	3,5	26,4	0,32	1,31			
	II	9,0	22,6	64,5	2,50	2,04	—	—	—
		1,8	12,4	44,7	6,9	3,14			
	I/II ^{а,б}	—	—	—	—	—	3,1 9,2	0,20 0,28	—,2 —,5

* Числа над чертой — данные для горчицы, под чертой — для мари.

** Соотношение в I и II фракциях содержания изученных веществ.

Учитывая относительность как степени очистки ядер от цитоплазмы, так и полноты разделения НК и белков ядра по фракциям (⁷, ¹⁴), мы стремились в первую очередь выявить сам факт стабильности или изменчивости состава ядерных фракций верхушек мари и горчицы при смене общего направления морфогенетических процессов в ходе индукции цветения.

В табл. 1 видно, что общий выход клеточных ядер из ткани составляет по ДНК около 2% для мари и 9–10% для горчицы. Соотношение РНК/ДНК в ядерном материале по сравнению с тканью уменьшается для горчицы в 6 раз, для мари в 3,5 раза. Как и следовало ожидать, основная масса ДНК ядер находится в I фракции, а РНК — во II фракции (табл. 2). Белок ядерного материала делится между I и II фракциями в среднем примерно поровну. Можно отметить два типа изменений, имеющих одинаковую динамику у обоих растений.

Во-первых, в ходе фотопериодической индукции изменяется распределение ДНК между I и II фракциями. В период инициации цветения в стеблевых почках заметно увеличивается переход ДНК во II фракцию, содержащую основное количество РНК ядерного материала. Во время фото-

периодической индукции у горчицы во II фракцию переходит в 2 раза больше ДНК, а у мари — в 10 раз больше, чем у вегетативных растений. После окончания индукции извлекаемость ДНК раствором 2 М NaCl восстанавливается до прежнего уровня. В качестве одной из предположительных причин этого явления можно указать на возможность интенсификации образования комплексов ДНК — РНК во время фотопериодической индукции цветения в связи с активацией транскрипции в этот период. Увеличение количества и изменения качественного состава комплексов ДНК — РНК во время фотопериодической индукции цветения было найдено у красной мари и у ипомеи (¹⁵, ¹⁶).

Во-вторых, в ходе фотопериодической индукции изменяется распределение белка между I и II фракциями. У обоих видов растений общее направление изменения в распределении белка между I и II фракцией совпадает с таковым для ДНК. Соотношение белок I фракции/белок II фракции относительно высоко у вегетирующих растений мари и горчицы, заметно снижается во время фотопериодической индукции цветения и вновь увеличивается после ее завершения. Так как в I фракцию переходят преимущественно белки ДНП, в том числе гистоны, а во II фракцию — кислые белки, то изменение распределения белка между I и II фракциями указывает на количественный сдвиг в качественно различных белковых компонентах клеточного ядра.

Ввиду того, что белкам клеточного ядра придают большое значение в регуляции морфогенетических процессов, отводя им роль репрессоров транскрипции, была прослежена более подробная динамика распределения белка между I и II фракциями у мари и горчицы в ходе фотопериодической индукции. Результаты показаны на рис. 2, где приведено соотношение белок I фракции/белок II фракции. Данные выражены в процентах от величины этого соотношения у вегетативного контроля, принятой за 100%. Как видно на рисунке, динамика распределения белка между I и II фракциями имеет одинаковую форму для длиннодневного и короткодневного видов растений и связана скорее с процессом инициации цветения, чем с непосредственным влиянием длины дня на рост.

Таким образом, при суммарном анализе целых верхушек мари и горчицы общее содержание ДНК на единицу веса ткани не изменяется в ходе фотопериодической индукции, а общее содержание РНК изменяется параллельно интенсивности как ростовых, так и формообразовательных процессов. В отличие от этого, извлекаемость ДНК и белка из материала клеточных ядер верхушек растворами соли и щелочи коррелирует с процессом индукции цветения. Во время индукции снижается экстрагируемость ДНК и белка раствором 2 М NaCl, и увеличивается извлекаемость 0,05 М раствором NaOH.

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

Поступило
11 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. А. Васильева, Л. В. Гофштейн, ДАН, 197, 696 (1964) ² С. Н. Lowry, J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- ³ G. Guinn, Plant Physiol., 41, 4, 689 (1966).
- ⁴ А. С. Спирин, Биохимия, 3, 396 (1958).
- ⁵ Г. П. Георгиев, Л. П. Ермолаева, И. Б. Збарский, Биохимия, 25, 318 (1960).
- ⁶ W. I. Steele, H. Busch, Cancer Res., 23, 1153 (1963).
- ⁷ Н. А. Васильева, Г. Г. Белкина и др., Биохимия, 34, 1239 (1969).
- ⁸ И. Б. Збарский, В сборн. Структура и функция клеточного ядра, «Наука», 1967, стр. 111.
- ⁹ Г. Буш, Гистоны и другие ядерные белки, М., 1967.
- ¹⁰ N. O. Lindh, B. L. Brantmark, Methods of Biochemical Analysis, 14, 80 (1966).
- ¹¹ A. Lance-Nougarede, R. Bronchart, C. R., 260, 3140 (1965).
- ¹² R. Bronchart, G. Bernier, J. M. Kinet, Int. Symp. Cell. Molec. Aspects Floral Induction, Liege, 1967.
- ¹³ A. H. Rijven, L. T. Evans, Austral. J. Biol. Sci., 20, 1 (1967).
- ¹⁴ В. Г. Конарев, С. И. Сахаутдинова, Б. Х. Буракаева, ДАН, 160, № 5, (1965).
- ¹⁵ J. D. Watson, R. E. Matthews, Austral. J. Biol. Sci., 99, 967 (1966).
- ¹⁶ K. Joshida, K. Umemura et al., Plant and Cell Physiol., 8, 97 (1967).