

Л. М. КРЮКОВА, Л. Ф. НАЗАРОВА

**ИЗМЕНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ  
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЯДЕР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ  
ОБЛУЧЕНИИ И ОБРАБОТКЕ РАСТЕНИЙ ГИББЕРЕЛЛИНОМ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 8 VII 1971)

Показано, что уменьшение лучевых повреждений растений достигается с помощью ростовых веществ, как природных, так и синтетических <sup>(1)</sup>. Нами и другими исследователями было показано, что одним из перспективных в этом направлении фитогормонов является гибберелловая кислота, обладающая широким спектром действия <sup>(3, 10, 11)</sup>.

Однако механизм действия ростовых веществ как препаратов, уменьшающих лучевые повреждения растений, остается недостаточно исследованным. Пытаясь подойти к расшифровке действия гиббереллина — вещества, восстанавливающего рост облученных растений, мы исследовали его действие на нуклеопротеидные структуры ядра. Для этого был применен метод флуоресцентной микроскопии. Этот метод в настоящее время находит все большее использование в биологии, как весьма чувствительный для обнаружения тех незначительных физико-химических изменений, которые возникают под влиянием различных факторов.

С помощью метода люминесцентной микроскопии в клетках облученных животных, окрашенных флуорохромом акридиновым оранжевым (АО), было обнаружено изменение интенсивности зеленого свечения ядер <sup>(2, 16)</sup>.

При наличии двунитчатой структуры нуклеиновых кислот акридиновый оранжевый прослаивается между нуклеотидными парами нативной ДНК и вызывает зеленое свечение под воздействием ультрафиолетовых лучей. В случае связывания АО с  $PO_4$  — группами неспирализованных участков нуклеиновых кислот — образующиеся комплексы дают красное свечение <sup>(3-5)</sup>.

Обладая сродством к нуклеопротеидам, АО позволяет получить отчетливые различия между нормальными и поврежденными клетками. Методом люминесцентной микроскопии было обнаружено увеличение интенсивности зеленого свечения ядер в клетках животных не только при непосредственном действии проникающей радиации <sup>(6)</sup>, но также и при действии радиотоксинов — экстрактов, выделенных из облученных растений <sup>(7)</sup>.

Изменение количества нуклеиновых кислот в облученных растениях было обнаружено не только при прямом действии радиации, но также и при дистанционном действии, т. е. под влиянием радиотоксинов <sup>(8, 9)</sup>. Однако, если облученные растения обработать гибберелловой кислотой, то происходит как восстановление деления клеток и уменьшение хромосомных повреждений <sup>(10)</sup>, так и нормализация нуклеинового обмена <sup>(11)</sup>. Поэтому нашей задачей было с помощью метода люминесцентной микроскопии установить некоторые физико-химические изменения нуклеопротеидного комплекса, главным образом ДНК, которые происходят под влиянием облучения и гибберелловой кислоты.

Объектами исследования являлись корни 4-дневных проростков бобов Русские черные. Средняя длина корней была 2,5—3 см. Проростки тоталь-

но облучали  $\gamma$ -лучами в дозе 5 кр на установке Гупос ( $Cs^{137}$ ). Сразу после облучения контрольные и опытные растения обрабатывали раствором гиббереллина (25 мг/л) в течение 10 час. путем погружения проростков корнями в раствор. Обработка растений проводилась по следующей схеме: 1) вода, 2) гибберелловая кислота, 3) облучение, 4) облучение + гибберелловая кислота, 5) экстракт из облученных (25 кр) растений (1:5), 6) экстракт из необлученных растений (1:5). Экстракты из клубней картофеля получали по методике (<sup>12</sup>), но не  $H_2O$ , а этиловым спиртом.

Препараты для люминесцентной микроскопии делали по методу Бер-таланфи (<sup>13</sup>) в некоторой модификации для растений. Раствор АО готовили на фосфатцитратном буфере Мак-Ильвена при pH 4,3.

После соответствующей 10-часовой обработки растения помещали в воду на 10 час., а затем готовили препараты. Срезы корня толщиной 50 мм де-

Таблица 1

Изменение интенсивности флуоресценции нуклеиновых кислот в ядрах растительных клеток, окрашенных акридиновым оранжевым

№№ п. п.	Варианты (обработка растений) *	Число ядер	Интенсивность свечения	
			см	%
1	Контроль	144	60 ± 4,7	100
2	ОРТ	135	94 ± 6,7	157
3	5 кр	127	100 ± 7,0	167
4	НРТ	69	61 ± 3,0	102
5	ОРТ	83	94 ± 4,5	157

\* Корни обрабатывали экстрактом, выделенным из 4-дневных проростков бобов Русские черные, облученных в дозе 5 кр (№ 2); выделенными из 14-дневных растений бобов (№ 4); выделенными из 14-дневных растений бобов, облученных в дозе 25 кр (№ 5).

лали на салазочном замораживающем микротоме на расстоянии 2 мм от кончика и сразу погружали их в 96% этанол. Для анализа с каждого среза брали по 5 ядер, расположенных в шахматном порядке, ближе к периферической части среза. В каждом варианте было просмотрено не менее 15 корней. Сразу после приготовления препараты просматривали на микроскопе МЛ-2. Изменение интенсивности свечения АО, связанного с нуклеопротеидами (НП) в ядрах, регистрировали фотоумножителем ФЭУ-56.

Облучение растений или обработка необлученных растений гибберелловой кислотой способствует увеличению интенсивности свечения ядер (50—60 см в контроле, 70—80 см после гиббереллина, 80—90 см после облучения). Однако в 4-м варианте, в котором растения после облучения обрабатывали гиббереллином, наблюдается снижение интенсивности свечения ядер (50—60 см).

Результаты исследования действия прямого облучения и радиотоксинов, т. е. экстрактов из облученных растений, представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что интенсивность свечения ядер выше у тех растений, которые были облучены  $\gamma$ -лучами в дозе 5 кр или обработаны экстрактом из облученных растений, по сравнению с контрольными растениями. Из литературы известно, что в клетках облученных животных интенсивность свечения флуорохрома, адсорбированного на нуклеопротеидных структурах ядра, усиливается (<sup>2, 15, 16</sup>). Так как при флуоресцентном измерении количество света, падающего на катод фотоумножителя, прямо пропорционально количеству связанного флуорохрома и интенсивности поглощенного объектом возбуждающего света (<sup>14</sup>), то можно предположить, что любой из использованных нами факторов оказывает влияние на нуклеопротеиды, вызывая усиленное связывание АО с ДНП ядра, вследствие изменения их физико-химического состояния. Возможно, что облучение и

экстракты из облученных растений оказывают аналогичное действие и приводят к изменению связи между белком и ДНК в нуклеопротеидном комплексе. Некоторые авторы считают, что облучение вызывает лабильзацию между белком и ДНК (<sup>17</sup>). М. Н. Мейсель (<sup>18</sup>) трактует это явление как результат денатурации ДНК и отщепление ДНК от белка.

Интересно отметить, что гибберелловая кислота совершенно по-разному действует на облученные и необлученные растения. С одной стороны, гиббереллин восстанавливает поврежденный радиацией геном клетки. С другой, увеличивает интенсивность свечения АО ядер клеток после обработки контрольных растений. Гибберелловая кислота, вероятно, способствует не только увеличению синтеза нуклеиновых кислот, но и, возможно, изменяет физико-химические свойства ДНК. Каким путем это происходит, пока остается неясным. Тем не менее можно отметить, что гиббереллин, восстанавливая поврежденный радиацией геном клетки, способствует восстановлению физиологических процессов, облученных растений, о чем свидетельствуют многочисленные работы в данном направлении (<sup>1, 10, 11</sup>).

Таким образом, метод люминесцентной микроскопии позволяет обнаружить малейшие повреждения и изменения структуры ДНК в ядрах клеток растений, подвергнутых действию ионизирующих излучений или радиотоксинов, выделенных из облученных растений.

В заключение считаем своим приятным долгом выразить благодарность В. Н. Карнаухову за ценные советы при проведении настоящей работы.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
25 VI 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. О. Гребинский, Биохимия растений, Киев, 1967. <sup>2</sup> В. А. Сондак, Биофизика, **2**, 495 (1957). <sup>3</sup> F. Buckatsch, Protoplasma, **34**, 3 (1940). <sup>4</sup> S. Stugger, Flora, **135**, 35 (1940). <sup>5</sup> N. Schümmelfeder, Naturwiss., **36**, 58 (1949). <sup>6</sup> Н. Б. Стражевская, В. А. Стручков, Радиобиология, **1**, 1 (1961). <sup>7</sup> Е. Г. Плышевская, В. Г. Соломонова, Сборн. Радиотоксины, 1966, стр. 58. <sup>8</sup> Н. П. Кораблева и др., Изд. АН СССР, сер. биол., № 4, 521 (1965). <sup>9</sup> В. И. Токарская и др., Сборн. Радиотоксины, 1966, стр. 71. <sup>10</sup> Л. М. Крюкова, Л. Ф. Назарова, ДАН, **187**, № 2, 453 (1969). <sup>11</sup> Л. М. Крюкова, К. К. Мухамбетжанов, Сборн. Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем, «Наука», 1969, стр. 266. <sup>12</sup> Л. М. Крюкова, А. М. Кузин, Биофизика, **5**, 449 (1960). <sup>13</sup> L. Bertalanffy, L. Bickis, J. Histochem. and Cytochem., **4**, № 5, 481 (1956). <sup>14</sup> И. Е. Брумберг, Цитология, **21**, № 2 (1969). <sup>15</sup> Г. П. Торопова, Г. П. Поздняков, Медицинская радиология, № 3, 4 (1959). <sup>16</sup> М. Н. Мейсель, А. В. Гуткин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 693 (1961). <sup>17</sup> R. Rigler, Acta physiol. scand., **67**, Suppl. 267 (1966).