

Л. В. КОВАЛЕВА, Н. А. МУСАТОВА

**РИБОНУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНАХ  
ПЕТУНИИ В СВЯЗИ С ФОРМИРОВАНИЕМ МЕХАНИЗМА  
САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ**

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 19 III 1975)

Весьма распространенным объектом при изучении самонесовместимости половых элементов гаметофитного типа при опылении является петуния (*Petunia hybrida*). Этот тип несовместимости проявляется в неспособности пыльцевых трубок проникать на всю длину столбиков и осуществлять оплодотворение, хотя и пыльца, и пестик функционально активны. Несмотря на широкое изучение этого явления (<sup>1-5</sup>), механизм его до сих пор не ясен. Гипотеза Льюиса, принимаемая многими исследователями, предполагает, что в основе механизма самонесовместимости гамето-

Таблица 1

Удельная рибонуклеазная активность в генеративных органах  
петунии (в усл. ед. на 1 мг белка среды)

|                                                        | Самосовместимый клон | Самонесовместимый клон |
|--------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|
| Пыльца из открытых цветков                             | 3,2                  | 3,0                    |
| Неопыленные пестики из цветков за 1 сутки до раскрытия | 5,3                  | 9,8                    |
| Опыленные пестики через 3 часа после опыления          | 7,8                  | 13,2                   |

фитного типа лежит кодируемый геном несовместимости синтез специфических полипептидов в пыльце и пестиках (<sup>6</sup>).

Нами в работе (<sup>7</sup>) показано, что формирование самонесовместимости у петунии происходит в период развития цветка и заканчивается накануне его раскрытия. Обработка бутонов в этот период оливомицином приводила к снятию несовместимости, что указывало на необходимость синтеза РНК для формирования механизма самонесовместимости. Последнее позволяет предположить, что формирование самонесовместимости происходит в результате включения в работу клетки новой информации. Так как поддержание на необходимом количественном уровне носителей этой информации — информационных РНК — является, по-видимому, одной из функций рибонуклеаз (<sup>8,9</sup>), то целью данной работы и послужило выяснение вопроса о количественном и качественном уровнях содержания РНКазной активности в цитоплазме формирующихся генеративных органов петунии двух клонов: самосовместимого и самонесовместимого.

Материалом служили пыльца, опыленные и неопыленные пестики петунии совместимого и самонесовместимого клонов. Неопыленные пестики брали из цветков за 3—4 суток до раскрытия и накануне раскрытия. Опыленные пестики собирали через 3 часа после опыления.

Гомогенизацию материала проводили в фарфоровой ступке 10 объемами 0,01 М трис-HCl-буфера (рН 8,6), содержащего 0,4 М сахарозу, в течение

ние 30 мин. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 140 000 g в течение 1 часа. В надосадочной жидкости изучали рибонуклеазную активность. Все операции проводили при температуре 2°.

Рибонуклеазную активность определяли по Вандендришу и Стоксу в модификации Татарской (<sup>10</sup>) при pH 6,0. Субстрат (дрожжевую РНК) растворяли в ацетатном буфере pH 6,0 (из расчета 2 мг на 1 мл инкубационной среды). В опытах с оливомицином инкубационная смесь состояла на+0,2 мл раствора РНК. Инкубация — при 47° в течение 1 часа (<sup>11</sup>). Реакцию останавливали 0,2 мл 22% хлорной кислоты. Выпавшие осадки отделяли центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость спектрофотометрировали при 260 мкм на СФ-16. Удельную активность рассчитывали на 1 мг белка инкубационной среды. Белок определяли по Лоури после диализа.

Перед диск-электрофоретическим разделением белков последние с целью концентрирования осаждали сульфатом аммония по Бронуицкой и Горетову (<sup>12</sup>). Осажденные белки отделяли центрифугированием при 4000 g 15 мин., растворяли их в 0,01 M трис-HCl-буфере (pH 6,0) и после 15-часового диализа вносили в трубки с гелем.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Дэвису (<sup>13</sup>) при напряжении 300 в и силе тока 3 ма на трубку в щелочной буферной системе и при напряжении 80 в и силе тока 3 ма на трубку в кислой системе в течение 3 час. в аппарате фирмы «Reanal» (Венгрия).

Рибонуклеазную активность на гелях после электрофореза определяли по Уилсону (<sup>14</sup>), с использованием в качестве субстрата дрожжевой РНК.

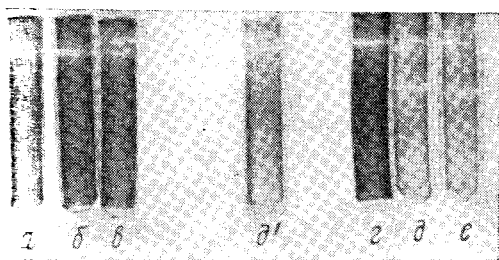


Рис. 2. Диск-электрофоретическое разделение белков с рибонуклеазной активностью из цитоплазматических фракций пестиков петунии. Пестики совместимого клона: а — неопыленные за 3–4 суток до раскрытия цветков, б — неопыленные за 1 сутки до раскрытия цветков, в — опыленные (через 3 часа после опыления). Пестики самонесовместимого клона: а' — неопыленные за 3–4 суток до раскрытия цветков, б' — неопыленные за 1 сутки до раскрытия цветков, в' — опыленные (через 3 часа после опыления).

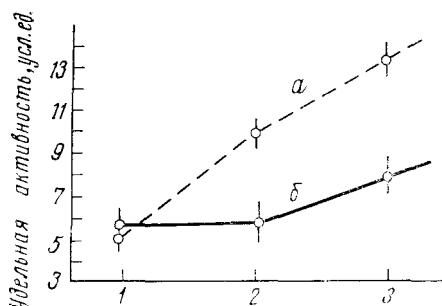


Рис. 1. Изменение удельной рибонуклеазной активности пестиков в процессе развития и при опылении. а — самонесовместимый клон, б — самосовместимый клон. По оси абсцисс: 1 — неопыленные пестики за 3–4 дня до раскрытия, 2 — за 1 сутки до раскрытия, 3 — опыленные пестики через 3 часа после опыления.

Для этого гели вынимали из трубок, инкубировали с РНК при 47° в течение 1 часа, окрашивали раствором 0,2% толуидинового синего в 0,1% уксусной кислоте в течение 1 часа, затем отмывали 2% уксусной кислотой и промывали водой. Полученные данные приводятся в табл. 1.

Видно, что уровень рибонуклеазной активности в пыльце из цветков совместимого и самонесовместимого клонов примерно одинаков и что он ниже уровня активности в неопыленных пестиках из цветков обоих клонов.

После опыления уровень рибонуклеазной активности близок по величине к сумме активностей неопыленных пестиков и пыльцы, причем

это касается как совместимого, так и несовместимого клона. Увеличение рибонуклеазной активности в опыленных пестиках (рис. 1) происходит, вероятно, за счет функционирования рибонуклеазной активности пыльцы. В пользу такого предположения говорят данные по электрофоретическому разделению белков с рибонуклеазной активностью из опыленных пестиков при совместимом (рис. 2, в) и несовместимом (рис. 2, е) опылениях, где получено по одной дополнительной полосе, совпадающих между собой по электрофоретической подвижности по сравнению с неопыленными пестиками.

При сравнении рибонуклеазной активности в пестиках двух клонов (см. выше) видим, что рибонуклеазная активность в неопыленных пестиках самонесовместимого клона почти в 2 раза выше, чем в неопыленных

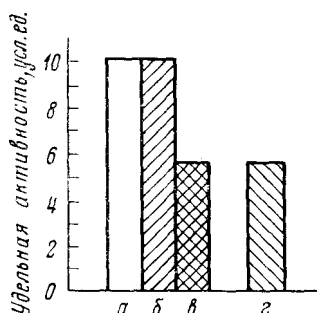


Рис. 3. Изменение рибонуклеазной активности в неопыленных самонесовместимых пестиках после обработки оливомицином. За 1 сутки до раскрытия цветков: без обработки оливомицином (а), после обработки оливомицином (*in vitro*) (б), после обработки оливомицином в бутонах (в); пестики совместимого клона за 1 сутки до раскрытия цветков без обработки оливомицином (г)

пестиках совместимого клона. В данном случае анализировали пестики только накануне раскрытия цветков — в период функционирования механизма самонесовместимости. Этот факт послужил основанием для изучения рибонуклеазной активности за 3—4 суток до раскрытия цветков, т. е. когда механизм самонесовместимости, по нашим данным, еще не функционирует. Как видно из рис. 1, в этот период развития цветков в пестиках обоих клонов наблюдается одинаковый уровень рибонуклеазной активности.

Данные рис. 1 свидетельствуют также о постоянном уровне рибонуклеазной активности в процессе развития пестиков совместимого клона, в случае же самонесовместимого клона наблюдали совершенно иную картину: за 1 сутки до раскрытия цветков в пестиках установлено резкое увеличение рибонуклеазной активности. В этот период развития цветков механизм самонесовместимости, по нашим данным, начинает функционировать. Такой факт дает основание предполагать, что высокий уровень рибонуклеазной активности в пестиках самонесовместимой петунии в этот период развития цветков может быть связан с процессом формирования самонесовместимости.

Для выяснения вопроса о том, является ли резкое увеличение рибонуклеазной активности в пестиках самонесовместимых цветков накануне их раскрытия результатом количественных изменений в белках с рибонуклеазной активностью или здесь имеют место и качественные различия, мы использовали диск-электрофоретическое разделение этих белков в полиакриламидном геле, результаты которого представлены на рис. 2.

В неопыленных пестиках, взятых из бутонов за 3—4 суток до раскрытия, у самосовместимых (рис. 2, а) и самонесовместимых (рис. 2, г) растений обнаружена одна зона с рибонуклеазной активностью, т. е. в этот период развития не обнаружено не только количественных (рис. 1), но и качественных различий в белках с рибонуклеазной активностью.

В пестиках из бутонов за один день до раскрытия у совместимых растений (рис. 2, б) выявилась также одна зона, по электрофоретической подвижности совпадающая с таковой в неопыленных пестиках из бутонов за 3—4 суток до раскрытия, а у несовместимых (рис. 2, д) выявлена еще одна зона. Таким образом, увеличение рибонуклеазной активности в самонесовместимых пестиках перед открытием цветков (рис. 1 и данные по рибонуклеазной активности), очевидно, является результатом синтеза нового белка с рибонуклеазной активностью.

Для проверки предположения об участии белков с рибонуклеазной активностью в формировании механизма несовместимости использовали оливомицин — ингибитор синтеза РНК, который в наших предыдущих опытах тормозил формирование самонесовместимости. Если повышение уровня рибонуклеазной активности в процессе развития пестиков самонесовместимого клона действительно связано с формированием механизма самонесовместимости, то можно предположить, что после обработки таких пестиков оливомицином уровень рибонуклеазной активности в них изменится. Результаты этих опытов представлены на рис. 3. Уровень рибонуклеазной активности в пестиках из бутонов самонесовместимых растений (рис. 3, а) при введении оливомицина в бутоны за 2—3 суток до раскрытия цветков уменьшается (рис. 3, в) до уровня рибонуклеазной активности в пестиках совместимых растений (рис. 3, г). Эти данные говорят в пользу предположения в том, что более высокий уровень рибонуклеазной активности в пестиках самонесовместимых растений связан с процессом формирования самонесовместимости.

В опытах *in vitro* при добавлении оливомицина к экстракту рибонуклеазы из пестиков самонесовместимых растений активность рибонуклеазы не меняется (рис. 3, а, б); следовательно, действие оливомицина при введении его в бутоны, вероятно, было направлено на подавление синтеза белка с рибонуклеазной активностью. И действительно, как видно из рис. 2, д', при введении оливомицина в бутоны самонесовместимых растений за 2—3 суток до раскрытия цветков исчезает образованный в процессе формирования самонесовместимых пестиков белок с рибонуклеазной активностью.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о том, что формирование механизма несовместимости, происходящее в процессе развития цветка, сопровождается появлением в пестиках в «рабочем» состоянии совершенно новых мРНК, уровень которых, возможно, и регулируется качественно новым белком с рибонуклеазной активностью, образованным в процессе формирования несовместимости.

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

Поступило  
6 III 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> E. East, *Bibliogr. Genetica*, v. 5, 331 (1929). <sup>2</sup> H. F. Linskens, *Genetics to-day*, v. 3, 629 (1965). <sup>3</sup> Г. Ф. Линскенс, *Физиол. раст.*, т. 20, в. 1 (1973). <sup>4</sup> И. М. Суриков, В сб.: *Усп. совр. генетики*, в. 4, «Наука», 1972, стр. 119. <sup>5</sup> И. М. Молчан, *Изв. ТСХА*, в. 3 (1974). <sup>6</sup> D. Lewis, *Genetics to-day*, v. 3, 657 (1965). <sup>7</sup> Л. В. Ковалева, Н. А. Мусатова, Е. А. Бритиков, *ДАН*, т. 222, № 6 (1975). <sup>8</sup> A. Gribnau, *Thesis Kath. Univers., Nijmegen*, 1970. <sup>9</sup> Л. П. Овчинников, *Усп. биол. хим.*, т. 9 (1968). <sup>10</sup> Р. И. Татарская, И. М. Абросимова-Омельяничук и др., *ДАН*, т. 157, 725 (1964). <sup>11</sup> J. Schrauwen, H. F. Linskens, *Planta*, v. 102, 4 (1972). <sup>12</sup> З. С. Броницкая, В. П. Горетов, *Прикл. биохим. и микробиол.*, т. 6, 707 (1967). <sup>13</sup> B. Y. Davies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, 404 (1964). <sup>14</sup> C. M. Wilson, *Anal. Biochem.*, v. 31, 506 (1969).