

8. Караман И. П. Автореф. канд. дисс., Кишинев, 1974.
9. Курсаков А. Л. Транспорт ассимилятов в растении, М., 1970.
10. Озол А., Губарь Г., Петерсон Э. В. В сб.: Общие закономерности роста и развития растений. 263—267, Вильнюс, 1965.
11. Осипова О. П. ДАН СССР, 57, 8, 799—801, 1947.
12. Рубин Б. А., Германова В. Ф. ДАН СССР, 107, 5, 757—760, 1956.
13. Рубин Б. А., Германова В. Ф. Усп. совр. биол., 46, 3, 366—383, 1958.

Получено 19 IV 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 12 (42), 1989

УДК 581.182

## СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДРАХ И ЗАРОДЫШАХ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИББЕРЕЛЛИНА

Р. Р. ВАРДАПЕТЯН\*, Н. А. ДАВТЯН\*\*, С. Г. ТИРАЦУЯН\*, М. А. ДАВТЯН\*\*

Ереванский государственный университет, \*кафедра биофизики, \*\*кафедра биохимии  
и проблемная лаборатория эволюционной биохимии

На зародышах и изолированных ядрах зародышей озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. показано, что гиббереллин  $A_3$  ( $5 \times 10^{-5}$  M) стимулирует включение  $^3H$ -УТФ и  $^3H$ -ТТФ в кислотонерастворимую фракцию, стимулирующий эффект увеличивается в процессе прорастания. Включение метки в ДНК и РНК в изолированных ядрах значительно возрастает, если зародыши предварительно прорастиваются в присутствии гиббереллина. Сделан вывод об участии гиббереллина в регуляции транскрипционной и репликационной активности ядерного генома.

*Triticum aestivum* L. աշնանցան զորնի սաղմերում և մեկուսացված կորիզներում  $A_3$  ( $5 \times 10^{-5}$  M) գիբերելինը խթանում է  $^3H$ -ՍԻՅՅ-ի և  $^3H$ -ՏՅՅ-ի մուտքը քիմում անլուծելի ֆրակցիա, ընդ որում, զրման ընթացքում խթանման աստիճանը մեծանում է: Սաղմոսակերտ և մասնատվածների մուտքը մեկուսացված կորիզների ԴՆԲ և ՐՆԲ քանականաչար անում է, սրի սաղմերը նախորդ լուծվելի են գիբերելինի աղկալույթյանը: Ենթադրվում է, որ գիբերելինը մասնակցում է ինչպես կորիզային գենոմի ակտիվացմանը, այնպես էլ սպանսկրեպչանքի և ռեպլիկացիայի կարգավորմանը:

On embryos and isolated nuclei of winter wheat *Triticum aestivum* L. it was shown that gibberellin  $A_3$  ( $5 \times 10^{-5}$  M) stimulated insertion of  $^3H$ -UTP and  $^3H$ -TTP into acid-insoluble fraction, stimulating effect increased in the process of the germination. DNA and RNA synthesis of isolated nuclei increased if embryos germinate in the presence of gibberellin in advance. There was been the conclusion about the participation of gibberellin in the regulation of transcriptional and replicational activity of nuclear genome.

Ядро и зародок пшеницы—гиббереллин—кислоты нуклеиновые.

Усиление синтеза РНК и белков под действием гиббереллина было показано на многих растительных объектах [3, 7]. Однако использова-

Сокращения: ГК—гиббереллин, Бк—беккерель, ТХУ—трихлоруксусная кислота, АТФ—аденозин трифосфат, ГТФ—гуанидин трифосфат, ТТФ—тимидин трифосфат, УТФ—уридин трифосфат, ЦТФ—цитидин трифосфат.

ни целого семени не дает ответа на вопрос о характере прямого действия гиббереллина на зародыш. С другой стороны, инкубирование зародышей пшеницы соответствующими ингибиторами и последующее наблюдение за их ростом и метаболизмом указывает на необходимость синтеза РНК и ДНК на ранних этапах прорастания [5]. Аналогичные эффекты наблюдаются при исследовании изолированных ядер [8, 9], причем синтез РНК в изолированных ядрах качественно отличается от такового в контрольных. Поэтому для изучения взаимодействия гормона с ядром представляется целесообразным исследование непосредственного влияния гормона на синтез нуклеиновых кислот в изолированных ядрах. Однако имеющиеся данные не позволяют однозначно судить о действии гиббереллина на транскрипцию и репликацию.

Целью настоящей работы являлось исследование действия гиббереллина на синтез нуклеиновых кислот в изолированных ядрах и зародках пшеницы.

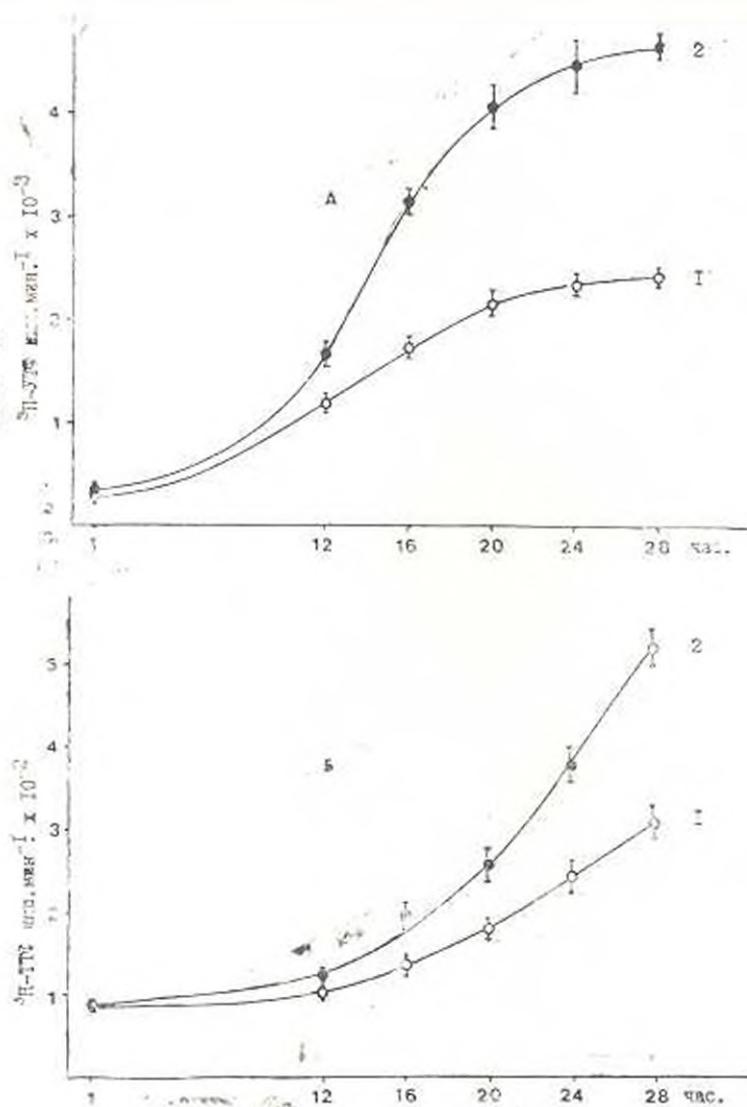
**Материал и методики.** Зародыши изолировали методом Джонстона и Штерна [6] из семян озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Безостая 1 репродукции 1986 г. Жизнеспособность зародышей проверяли тетразолиным методом [2]. Для этого зародыши замачивали в воде в течение 16 ч при 30° и погружали на 24 ч в 1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразоляхлорида (Хеманол, ЧССР) при pH 6 или 7. В качестве среды прорастания служил раствор 5 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 20 мМ KCl и 20 мкМ/мл сахарозы. Зародыши прорастивали как на контрольной среде, так и в присутствии  $5 \times 10^{-4}$  М гиббереллина  $A_3$  (Sigma, США) в предварительно стерилизованных чашках Петри в темноте при 26° в течение 0—48 ч. Через 24 ч их пересевали на новую стерилизованную питательную среду, содержащую 0,9% агара, 1% глюкозы и 0,01% стрептомицина. Определение синтеза ДНК и РНК проводили по методу Датта [5]. Для этого в питательную среду добавляли  $10^6$  Бк  $^3H$ -УТФ и  $^3H$ -ТТФ (специфическая активность 0,25 Ки/ммоль). В конце инкубационного периода зародыши промывали холодной водой, затем гомогенизировали сначала в 0,5 мл 10%-ной ТХУ, далее в 3 мл 5%-ной ТХУ с последующим центрифугированием суспензии при 24000 г в течение 30 мин. Из надосадочной жидкости отбирали аликвоты и просчитывали ее радиоактивность для определения включения изотопов в зародыш. ТХУ-нерастворимый осадок суспендировали в 2 мл 0,1 N NaOH, оставляли при комнатной температуре 30 мин и просветляли центрифугированием при 14000 g в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости отбирали аликвоты по 1 мл и определяли радиоактивность в 10 мл толуольного сцинтиллятора. Ядра из изолированных зародышей получали по методу Васильевой и Гофштейн [1] в глицериновом буфере.

Синтез ДНК и РНК в изолированных ядрах проводили в транскрипционной системе [9], которая содержала 0,1 мл ядерной суспензии, эквивалентные количества АТФ, ГТФ, ЦТФ (по 0,1 мМ), а также либо  $5 \times 10^6$  Бк  $^3H$ -УТФ, либо  $10^7$  Бк  $^3H$ -ТТФ всего 0,3 мл и присутствии 25 мМ Трис-HCl и 2 мМ  $MgCl_2$ , pH 8,0.

Для выявления прямого действия ГК на синтез нуклеиновых кислот в инкубационную смесь, содержащую ядра, выделенные из контрольных зародышей, добавляли ГК до конечной концентрации  $10^{-8}$  М [7]. Непосредственно перед инкубацией в смесь добавляли по 0,125 мл 0,3 мМ фосфокреатина и 1,5 мМ креатинфосфокиназы в том же буфере. Реакционную смесь инкубировали при 30° в течение 30 мин. После инкубации в смесь добавляли 0,5 мл альбумина (0,8 мг/мл), реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 10%-ной ТХУ. ТХУ-нерастворимый осадок осаждали на мембранных фильтрах «Милпор» № 4, промывали несколькими объемами 8%-ной ТХУ и высушивали промывочным абсолютным этанолом. Радиоактивные препараты измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике SL-3000 Intertechnique (Франция).

Количество ядер определяли в камере Горяева после предварительного разбавления в 700 раз. В таблице и на рисунках приведены средние из 8—10 экспериментов и их стандартные отклонения.

*Результаты и обсуждение.* Из рис. (А) видно, что включение  $^3\text{H}$ -УТФ в хроматин контрольных зародышей происходит уже в первые часы проращивания, возрастает в 7,5 раза к 12 часам и еще в два раза к 24 часу. Отметим, что в контроле после 24 ч проращивания существенно изменения скорости включения метки в хроматин не наблюдалось. Интенсивность включения  $^3\text{H}$ -УТФ в хроматин обработанных ГК зародышей



Динамика включения  $^3\text{H}$ -УТФ (А) и  $^3\text{H}$ -ТТФ (Б) в кислотонерастворимую фракцию прорастающих зародышей. 1—контрольные зародыши; 2—обработанные  $10^{-5}\text{M}$  гиббереллином. По оси абсцисс—время проращивания в часах, по оси ординат—радиоактивность включенной метки в импульсах в минуту на мг ДНК в пробе.

дышей превосходит аналогичный процесс в контроле в 1,3 и 1,9 раза, при проращивании в течение 12 и 28 ч соответственно. Стало быть, в обработанных зародышах значительно усиливается синтез (или накопления) РНК, причем гиббереллин индуцирует его по крайней мере в

течение 24 ч, что было показано ранее Ченом и Осборном [4]. Из рис. (Б), видно, что включение  $^{31}\text{P}$ -ТТФ в хроматиновую ДНК с 16 до 28 г. проращивания зародышей в присутствии ГК увеличивается от 144 до 178% по сравнению с контролем.

ГК активизирует синтез РНК в ядрах, изолированных из ростков карликового гороха [7]. Причем, если растения выращены в среде с ГК и отличаются более интенсивным ростом, то ядра из таких растений обладают большей транскрипционной активностью. Поэтому цель наших экспериментов заключалась в исследовании синтеза ДНК и РНК в изолированных ядрах зародышей пшеницы, прорастающих в присутствии  $\text{GK}_3$  в течение 3, 24, 48 часов.

Включение  $^3\text{H}$ -УТФ и  $^3\text{H}$ -ТТФ в кислотонерастворимую фракцию изолированных ядер, выделенных из прорастающих зародышей пшеницы

Время проращивания, ч

Среда проращивания	3			24			48		
	К	ГК	ГК*	К	ГК	ГК*	К	ГК	ГК*
СРМ $^3\text{H}$ -УТФ**	3355 $\pm 158$	3460 $\pm 176$	3316 $\pm 230$	3590 $\pm 70$	4096 $\pm 120$	3895 $\pm 72$	3860 $\pm 140$	4800 $\pm 120$	4508 $\pm 75$
ГК/К	1.000	1.037	0.990	1.000	1.141	1.085	1.000	1.244	1.168
СРМ $^3\text{H}$ -ТТФ**	3285 $\pm 130$	3366 $\pm 84$	3309 $\pm 140$	3496 $\pm 160$	3803 $\pm 187$	3439 $\pm 170$	3570 $\pm 190$	4240 $\pm 138$	3776 $\pm 85$
ГК/К	1.000	1.025	1.007	1.000	1.088	1.022	1.000	1.188	1.058

ГК\*—гиббереллин добавляется непосредственно в инкубационную среду.

\*\*—значения приведены из расчета  $5 \times 10^6$  ядер в инкубационной среде.

Из таблицы видно, что предварительная обработка зародышей  $\text{GK}_3$  существенно отражается на синтезе нуклеиновых кислот. Ядра, выделенные из прорастающих в присутствии  $\text{GK}_3$  зародышей, обнаруживают повышенную РНК-синтетическую активность. Аналогичная картина наблюдается и в отношении включения  $^{31}\text{P}$ -ТТФ в ТХЗ-нерастворимую фракцию, однако ГК во всех исследуемых экспозициях обработки действует на этот процесс слабее.

Инкубация ядер с  $\text{GK}_3$  также приводит к стимуляции включения меченых предшественников РНК и ДНК в кислотонерастворимую фракцию, однако эффект выражен гораздо слабее, чем при обработке зародышей  $\text{GK}_3$ .

Эти данные коррелируют с результатами исследования влияния *in vitro* добавленного гиббереллина в различных концентрациях на синтез РНК и ДНК в изолированных ядрах гороха [7].

Ранее было показано, что физиологическая активность ГК проявляется в полной мере, если проращивание проводят в его присутствии [4]. Считается, что ГК сама является стимулирующим агентом, необходимым для синтеза гиббереллиновых рецепторов. Возможно, именно этим и объясняется практическое отсутствие стимуляции  $\text{GK}_3$  включения



предшественников нуклеиновых кислот в ядра 3-часовых зародышей. По-видимому, в ядрах этих зародышей, прорастающих на контрольной среде, практически нет гиббереллиновых рецепторов из-за отсутствия синтеза эндогенного гиббереллина [10]. Вероятно, поэтому добавление ГК недостаточно для проявления РНК- и ДНК-синтетической активности этих ядер. Высокая синтетическая активность ядер зародышей, прорастающих в течение 3 ч в присутствии ГК, видимо, обусловлена быстрым транспортом ее в зародыш вместе с водой при набухании и синтезом гиббереллиновых рецепторов.

Результаты исследований синтетической активности ядер (табл.) согласуются с результатами изучения включения меченых предшественников нуклеиновых кислот в кислотонерастворимую фракцию при прорастании зародышей в присутствии этих предшественников (рис.).

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что обработка ГК зародышей пшеницы стимулирует не только метаболические процессы вообще, но и активизирует РНК- и ДНК-синтетическую активность ядерного генома в частности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Валишова Н. А., Гофштейн Л. В. ДАН СССР, 157, 3, 696, 1964.
2. Фирсова М. К. В кн. Жизнеспособность семян. М., 191, 1978.
3. Bewley J. D. In D. Boulter, B. Patthler, eds, Encyclopedia of Plant Physiology 14A. Springer-Verlag, Berlin, 559—586, 1982.
4. Chen D., Osborne D. J. Nature, 226, 1157, 1970.
5. Datta K., Marsh L., Marcus A. Plant Physiol., 72, 394—397, 1983.
6. Johnston F. B., Stern H. Nature (Lond.), 179, 160, 1957.
7. Johri M., Varner J. E. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 59, 269, 1969.
8. Luthé D. S., Quatrano R. S. Plant Physiol., 65, 305, 1980.
9. Luthé D. S., Quatrano R. S. Plant Physiol., 65, 309, 1980.
10. Moore T. C. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, 103, 1980.

Поступило 26.VI 1989 г.

### ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВ ACERACEAE, ANACARDIACEAE И BETULACEAE В СИСИАНСКОЙ ИСКОПАЕМОЙ ФЛОРЕ

Н. Г. ГОХТУНИ

Делается заключение, что в позднем плиоцене—раннем антропогене в Армении были группировки растительности, близкие к редколесьям.

Ազրախիցացիքուհի 1 արվում, որ ուշ պլիստոցենում—վաղ անտրոպոցենում Հայաստանում եղել են բուսական խմբավորումներ՝ մոտ նոսր անտառների:

A conclusion is made that in late pliocene—early anthropogene there were vegetation groupings in Armenia close to thin forests.