

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФОРМ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И РОСТ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

А. И. ГОРОВАЯ

Для понимания природы стимулирующего действия гуминовых кислот представляет интерес изучение влияния их на различные фазы роста растений.

Исходя из того, что одним из наиболее важных ростовых процессов является митоз и что ответственная за этот процесс редупликация дезоксирибонуклеиновой кислоты, мы провели настоящие исследования, задачей которых было выяснить, коррелирует ли влияние гуминовой кислоты на рост растений с влиянием ее на деление клеток, установить, как изменяется функциональное состояние ядер под влиянием гуминовой кислоты и определить изменение количества ДНК в них.

При постановке опытов мы исходили из рабочей гипотезы Л. А. Христовой (1965), согласно которой гуминовая кислота, находясь в ионно-дисперсном состоянии, поступает в растение и, метаболизируясь, усиливает окислительно-восстановительные процессы. Благодаря этому повышается энергетический потенциал растения, усиливается образование АТФ, за счет которой ускоряется регенерация нуклеозиддифосфатов в нуклеозидтрифосфаты. Последнее приводит к активации реакции Коренберга—Вейса, ускорению образования наиболее лабильных форм нуклеиновых кислот и увеличению потока информации при синтезе белков-ферментов и белков-конституентов. Все это и определяет влияние гуминовой кислоты на обмен веществ в растении и скорость ростовых процессов.

В схему опытов, кроме гуминовой кислоты, были включены АТФ и некоторые дифференцированные ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и белка (8-азогуанин, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза и хлорамфеникол).

8-азогуанин и рибонуклеаза являются специфическими ингибиторами синтеза РНК. По данным Шантрена [14] и других авторов [12], 8-азогуанин (аналог гуанина), включаясь в синтез РНК, изменяет ее состав и функциональное состояние. В результате получают измененную информационную форму РНК (*и*РНК) и «ложный» белок. Это приводит к нарушению энзиматического контроля над синтезом пуринов, и синтез белка прекращается.

Рибонуклеаза представляет собой белок-фермент альбуминового типа и является высокоспецифичной фосфодиэстеразой, расщепляющей рибонуклеиновую кислоту до кислоторастворимых моно- и олигонуклеотидов.

Дезоксирибонуклеаза также является высокоспецифичной фосфодиэстеразой, которая, расщепляя фосфоэфирную связь, деполимеризует ДНК до кислоторастворимых олигонуклеотидов. Интересно отметить, что ДНК-аза расщепляет ДНК из любых источников и обладает способностью задерживать размножение ДНК-содержащих вирусов [6]. В небольших концентрациях ДНК-аза стимулирует синтез ДНК в клетках, а в больших — ингибирует.

Хлорамфеникол является специфическим ингибитором синтеза бел-

ка. Этот яд нарушает белковый синтез на стадии переноса аминокислот от транспортной РНК к синтезируемой белковой молекуле и таким образом останавливает его на одной из промежуточных стадий [7, 10, 11]. По данным Якобсона и других [16], хлорамфеникол блокирует специфические процессы, необходимые для начала митозов, и дает антимитотический эффект.

Для того чтобы установить взаимосвязь между влиянием гуминовой кислоты на накопление энергии в клетках и делением их, в схему опытов включили 2,4-динитрофенол, являющийся специфическим ингибитором синтеза АТФ [15], так как разобщает окислительное фосфорилирование и дыхание.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты были поставлены с проростками кукурузы в трехкратной повторности. Семена кукурузы проращивали в чашках Петри (по 50 шт. в каждой) в темном термостате на фильтровальной бумаге, смоченной водой, при температуре 23—30°. После наклеивания семена пересаживали на растворы физиологически активных веществ и ингибиторов (см. схему опыта), где их выдерживали при том же режиме 24 часа. Полученные проростки пересаживали на новые растворы изучаемых веществ согласно схеме и выдерживали их в аналогичных условиях 36 часов, после чего производили учет опыта.

Схема опыта

№ варианта	Содержание вариантов	
	Среда, на которую пересажены	
	наклюнувшиеся семена	проростки
1	Вода	Вода
2	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
3	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л
4	8-азогуанин, $10^{-3}$ моль/л	8-азогуанин, $10^{-3}$ моль/л
5	То же	Вода
6	»	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
7	»	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л
8	РНК-аза, 1 мг/мл	РНК-аза, 1 мг/мл
9	То же	Вода
10	»	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
11	»	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л
12	ДНК-аза, 1 мг/мл	ДНК-аза, 1 мг/мл
13	То же	Вода
14	»	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
15	»	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л
16	Хлорамфеникол, 0,0025%	Хлорамфеникол, 0,0002%
17	То же	Вода
18	»	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
19	»	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л
20	2,4-динитрофенол, $10^{-3}$ моль/л	2,4-динитрофенол, $10^{-3}$ моль/л
21	То же	Вода
22	»	Гумат натрия, $3,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л
23	»	АТФ, $1,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л

У проростков измеряли длину корешков. Для цитологических исследований брали пробы с 10 кончиков средних корешков в каждом варианте по 5 мм длиной. Материал фиксировали по Карнуа 3:1 и окрашивали по Фельгену реактивом Шиффа, а также по Унна и Брассе метиловым зеленым с пиронином [1, 2, 5].

Для характеристики митотической активности клеток корневой меристемы проростков кукурузы из просмотренных в каждом варианте 5—6 тыс. клеток определяли митотический индекс, который выражали в промилле (число отдельных фаз митоза на 1000 клеток). Достоверность разницы средних арифметических ( $\pm$ ) вычисляли по методу Фишера — Стюдента.

По Беннингхоффу [13], имеет место корреляция между функциональным состоянием клеток и размером их ядер, а именно: при усилении специфической деятельности клеток наступает «функциональное набухание» ядер, а при угнетении функций клеток, наоборот, — «функциональное сморщивание их». Поэтому для характеристики функционального состояния изучаемых меристематических клеток мы определяли объемы их ядер. Диаметры ядер измеряли при помощи угломерного окулярного микрометра МБ-9-4 и по этим данным вычисляли объемы ядер. В каждом варианте измеряли 200 ядер.

Количество ДНК определяли фотометрическим методом на постоянных давленных препаратах, окрашенных по Фельгену. Фотометрировали интерфазные и телофазные ядра на однолучевом фотометре, смонтированном А. И. Шерудило по его двухволновому методу [9]. В каждом варианте фотометрировали 150—200 ядер. На основании полученных данных вычерчивали гистограммы. Математическую обработку полученных данных проводили по методу Урбаха [8].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные наших опытов показывают, что физиологически активные формы гуминовых кислот и АТФ способствуют более активному росту корешков проростков кукурузы, усиливают митотическую активность меристематических клеток и увеличивают размеры их ядер (табл. 1).

Таблица 1. Влияние физиологически активных веществ дифференцированных ингибиторов на рост корешков и на клетки корневой меристемы кукурузы

Варианты	Среда, на которую пересажены		Средняя длина корешка, см	Количество митозов на 1000 меристематических клеток, шт.	Средний объем ядер меристематических клеток, условные единицы	Количество ДНК на одно телофазное ядро, условные единицы
	наклюнувшиеся семена	проростки				
1	Вода	Вода	5,0	45,4 $\pm$ 4,9	2,88	0,310
2	Гумат натрия	Гумат натрия	7,8	66,6 $\pm$ 4,6	4,49	0,324
3	АТФ	АТФ	7,5	77,6 $\pm$ 6,2	5,47	0,327
4	8-азогуанин	8-азогуанин	2,7	1,8 $\pm$ 0,7	1,62	0,260
5	»	Вода	3,4	18,1 $\pm$ 3,6	2,97	—
6	»	Гумат натрия	5,1	50,1 $\pm$ 5,0	4,01	—
7	»	АТФ	5,6	52,0 $\pm$ 5,2	4,93	—
8	РНК-аза	РНК-аза	2,4	9,7 $\pm$ 2,9	1,88	0,300
9	»	Вода	2,7	30,7 $\pm$ 6,1	2,23	—
10	»	Гумат натрия	3,7	45,5 $\pm$ 4,5	4,30	—
11	»	АТФ	4,5	49,7 $\pm$ 4,9	4,04	—
12	ДНК-аза	ДНК-аза	3,7	9,0 $\pm$ 2,7	1,69	0,275
13	»	Вода	5,4	15,3 $\pm$ 4,5	1,75	—
14	»	Гумат натрия	7,3	47,0 $\pm$ 4,7	2,95	—
15	»	АТФ	6,1	50,5 $\pm$ 5,0	2,08	—
16	Хлорамфеникол	Хлорамфеникол	2,6	12,5 $\pm$ 2,5	1,99	0,310
17	»	Вода	3,2	18,0 $\pm$ 3,6	2,03	—
18	»	Гумат натрия	5,1	34,1 $\pm$ 3,4	3,63	—
19	»	АТФ	4,9	39,9 $\pm$ 4,0	4,03	—
20	2,4-динитрофенол	2,4-динитрофенол	2,1	2,1 $\pm$ 0,6	0,93	0,282
21	»	Вода	2,5	5,0 $\pm$ 1,5	0,94	—
22	»	Гумат натрия	3,0	17,0 $\pm$ 5,1	1,15	—
23	»	АТФ	2,8	23,5 $\pm$ 7,0	1,30	—

Анализируя изменение митотической активности клеток корневой меристемы по различным фазам митоза, видно, что митотический индекс в варианте с гуматом натрия и АТФ больше, чем на контроле (рис. 1), и ядра в этих вариантах значительно крупнее (табл. 1).

Все это говорит о том, что перечисленные вещества, оказывая стимулирующее действие на рост корешков проростков кукурузы, усиливают специфическую деятельность меристематических клеток.

Так как специфическая деятельность меристематических клеток характеризуется в первую очередь новообразованием клеток в результате митотического деления, а последнее характеризуется скоростью накопления ДНК накануне митоза [3], мы можем предположить, что физиологически активные вещества способствуют усилению синтеза ДНК. Подтверждением этого служат результаты фотометрического определения количества ДНК в ядрах. Гистограммы распределения встречаемости ядер по массе ДНК в них свидетельствуют о том, что в варианте с гуматом натрия имеет место стимуляция синтеза ДНК и достоверное увеличение массы ДНК на одно ядро (рис. 2).

В опыте с 8-азогуанином были получены эффект ингибирования роста корешков, снижение митотической активности меристематических клеток и уменьшение объемов ядер этих клеток (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что ядра меристематических клеток проростков, которые были подвержены действию 8-азогуанина, распределяются в области более мелких, и содержание ДНК в них уменьшилось. Аналогичные результаты были получены в опыте с рибонуклеазой (табл. 1).

Пересадка проростков с растворов указанных ингибиторов на воду и на среду, содержащую гумат натрия и АТФ, показала, что действие специфических ингиби-

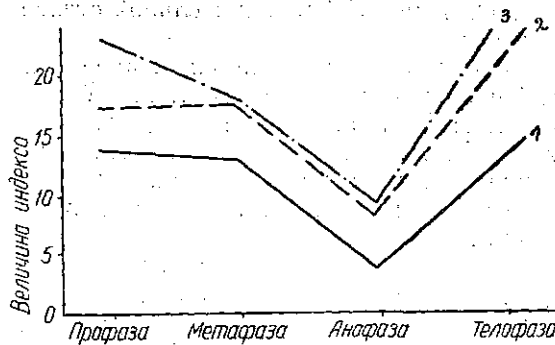


Рис. 1. Влияние гумата натрия и АТФ на различные фазы митоза корневой меристемы проростков кукурузы:

1 — первый вариант, 2 — второй, 3 — третий вариант.

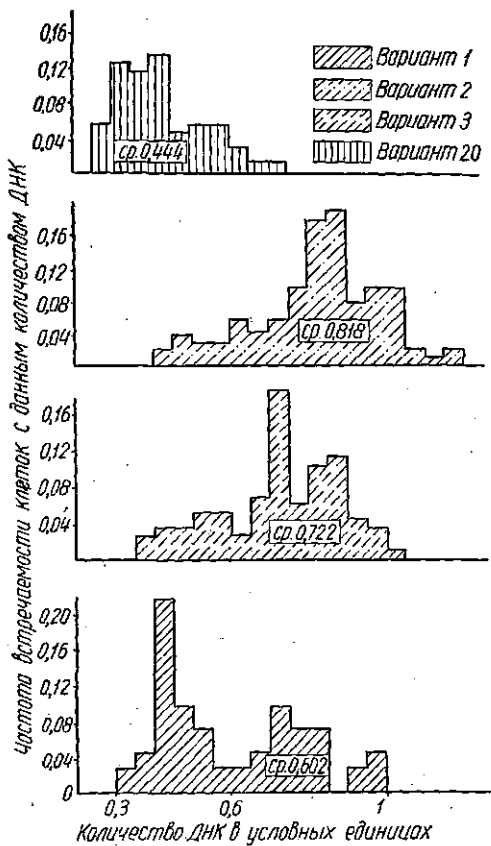


Рис. 2. Гистограммы распределения клеток меристемы проростков кукурузы по количеству ДНК на ядро под влиянием физиологически активных веществ.

торов синтеза РНК в значительной степени может быть снято этими веществами.

В том, что действие специфических ядов, ингибирующих синтез РНК и прежде всего иРНК, может быть в значительной степени снято физиологически активными веществами, мы видим подтверждение гипотезы Л. А. Христовой о том, что центральным местом приложения действия этих веществ является влияние их на синтез наиболее лабильных форм РНК, которые ответственны за передачу информации при синтезе белка.

Специфический ингибитор синтеза ДНК — дезоксирибонуклеаза — в нашем опыте оказал глубокое ингибирующее действие по всем изучаемым показателям (табл. 1). Действие ее может быть снято гуматом натрия и АТФ. Вода снимает действие этого яда очень слабо.

То, что действие специфического ингибитора синтеза ДНК может быть снято физиологически активными веществами, еще раз подтверждает наше предположение о влиянии этих веществ на усиление синтеза ДНК, по-видимому, за счет наиболее лабильных ее форм.

Ингибитор белкового синтеза — хлорамфеникол — в нашем опыте вызвал значительное торможение роста корешков; сильный антимиотический эффект в меристематических тканях и несколько уменьшил размеры клеточных ядер, не изменив содержание ДНК в них. Последнее совпадает с данными Ю. О. Сазыкина (1965) о подавлении белкового синтеза хлорамфениколом при продолжающемся синтезе нуклеиновых кислот.

При пересадке проростков с раствора хлорамфеникола на среду, содержащую гумат натрия и АТФ, имеют место активация роста корешков, восстановление митотической активности меристематических клеток и увеличение объемов их ядер, приводящие к снятию ингибирующего действия этого яда.

Поскольку хлорамфеникол является специфическим ингибитором синтеза белка и блокирует процессы, необходимые для начала митозов, нужно думать, что это блокирование связано с недостатком специфических ферментов, контролирующих эту фазу.

На основании того, что ингибирующее действие хлорамфеникола может быть в значительной степени снято физиологически активными веществами, можно предположить, что эти вещества могут устранить некоторые энзиматические дефициты в интерфазном ядре.

Специфический ингибитор синтеза АТФ — 2,4-динитрофенол — в опыте оказал сильное ингибирующее действие на рост корешков проростков кукурузы. Митотическое деление клеток под влиянием этого яда почти совсем остановилось. Анафазное расхождение хромосом к полюсам полностью отсутствовало и, если наряду с единичными фигурами — про- и метафаз — встречались телофазы, то они были сильно видоизменены. Это дает основание предположить, что эти телофазы образовались раньше действия на проростки 2,4-динитрофенола.

Гистограммы распределения встречаемости ядер по содержанию ДНК в них свидетельствуют о значительном снижении в них ДНК под влиянием 2,4-динитрофенола (рис. 2).

При пересадке проростков со среды, содержащей 2,4-динитрофенол, на растворы АТФ и гумата натрия эффект снятия ингибирующего действия этого яда выражается значительно слабее, чем во всех предыдущих опытах.

Важно подчеркнуть, что действие гумата натрия и АТФ во всех изучаемых нами случаях было близким. Это говорит о том, что действие физиологически активных форм гуминовых кислот в значительной степени определяется влиянием их на образование в растениях запасов

энергии в виде макроэргов, фосфорорганических соединений, которые потом используются на специфические процессы в митотических циклах меристематических тканей.

## ВЫВОДЫ

1. АТФ и физиологически активные формы гуминовых кислот повышают митотическую активность меристематических клеток корня проростков кукурузы.

2. Функциональное состояние меристематических клеток заметно улучшается под влиянием АТФ и физиологически активных форм гуминовой кислоты, о чем свидетельствует увеличение объемов ядер в этих клетках.

3. АТФ и физиологически активные формы гуминовых кислот усиливают накопление ДНК в ядрах меристематических клеток.

4. Специфическая деятельность меристематических клеток проростков кукурузы подавляется ингибиторами синтеза ДНК и РНК — ДНК-азой, РНК-азой и 8-азогуанином, а также хлорамфениколом, блокирующим синтез белка.

Действие указанных ядов может быть в значительной степени снято путем пересадки проростков на среду, содержащую физиологически активные вещества, — гуamat натрия и АТФ.

5. 2,4-динитрофенол, разобщающий окислительное фосфорилирование и дыхание, резко подавляет митотическую деятельность меристематических клеток. Его действие слабо снимается физиологически активными формами гуминовых кислот и несколько лучше — АТФ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Браше Ж. Биохимическая цитология. М., Изд. ИЛ, 1960.
2. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М., Изд. ИЛ, 1965.
3. Мэзия Д. Как клетки делятся. Сб. «Живая клетка». М., Изд. ИЛ, 1962.
4. Нейфах А. А. Использование ингибиторов нуклеинового обмена для исследования периодов морфологической функции ядер в развитии. Сб. «Клеточная дифференцировка и индуцированные механизмы». М., Изд. АН СССР, 1965.
5. Пирс Э. Гистохимия. М., Изд. ИЛ, 1962.
6. Салганик Р. И., Трухачев А. А. Действие ДНК-азы на размножение аденовируса в культуре ткани. Изд. СО АН СССР, 8, 2, сер. биол., 1963.
7. Скавронская А. Г., Борисова Н. Б., Гольдина Л. Р. Влияние левомицетина на интенсивность синтеза белка и нуклеиновых кислот у *E. coli*. «Микробиология, эпидемиология и иммунология», 1963, № 5.
8. Урбах В. Ю. «Математическая статистика для биологов и медиков». М., Изд. АН СССР, 1963.
9. Шерудило А. И. Цитофотометрия. Физические и биологические аспекты изучения клеточных ядер. Дисс. Новосибирск, Изд. СО АН СССР, 1965.
10. Aronson A., Spiegelman S. On the use of chloramphenicol inhibited systems for investigating RNA and protein synthesis. *Biochim et Biophys. acta* 1958, 29, 1.
11. Aronson A., Spiegelman S. Protein and ribonucleic acid synthesis in chloramphenicol inhibited system. *Biochim. et Biophys. acta*, 1961, 53, 1.
12. Bamberger L., Martin W., Streans L., Golleg W. Effect of 8-azoguanine one cleavage and nucleic acid metabolism in sea urchin *Strongylocentrotus Purpuratus* embryos. *Exper. Cell Res.* 1963, 31.
13. Benninghoff A. Funktionelle kernschwellung and kernschrumpfung. *Anat. Nachr.* 1950, 1.
14. Chantrenne H. *Arch. intern. physiol. et biochim.* 1961, 69, 6.
15. Lumis W., Lipman F. J. *Biol. Chem.* 1948, 195, 215.
16. Jacobson B., Salmon R., Lansky L. Antimitotic effects of chloramphenicol and other inhibitory agents in chlamydomonas. *Exper. Cell Res.* 1948, 36.

Проблемная лаборатория по гуминовым удобрениям при Днепропетровском сельскохозяйственном институте.