

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА НЕКОТОРЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПРИ ОБРАБОТКЕ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ ЗЕЛЕНЫМ ПРОЧНЫМ

С. Г. ТИРАЦУЯН, Р. Р. ВАРДАПЕТЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Показано, что обработка изолированных зародышей пшеницы $5 \cdot 10^{-4}$ % раствором зеленого прочного приводит к сильному изменению активности ряда дегидрогеназ. Активность изоцитрат- и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназ возрастает, а малат- и алкогольдегидрогеназ снижается, что отражается также на изоферментном спектре. Полученные результаты подтверждают высокую биологическую активность зеленого прочного.

Ключевые слова: зеленый прочный, дегидрогеназы, активность, изоферменты.

Проведенные ранее на кафедре биофизики эксперименты показали, что предпосевная обработка семян красителем зеленым прочным приводит к повышению урожайности многих сельскохозяйственных культур [3]. Изучение механизма этого эффекта представляется чрезвычайно важным как с теоретической, так и с практической точек зрения. Известно, что красители сходной структуры не только токсичны, но и вызывают сенсibilизированную инактивацию ряда ферментов. Следовательно, биологическая активность красителей, в частности зеленого прочного, может быть связана с их прямым или опосредованным влиянием как на активность отдельных ферментов, так и ряд важнейших ферментативных систем и циклов посредством выключения их отдельных звеньев.

Кроме того, зеленый прочный, являясь витальным анионным красителем трифенилового ряда с большим отрицательным зарядом (трех SO_3^- -групп), может образовывать прочные комплексы с основными белками вообще и с гистонами в частности. Взаимодействуя с гистонами, он частично нейтрализует их положительные заряды, тем самым ослабляя их связь с ДНК, что может привести к увеличению матричной активности хроматина, в свою очередь вызывающему повышение активности некоторых ферментов или ферментативных систем.

Целью наших экспериментов было исследование изменения активности ряда ферментативных систем при обработке изолированных зародышей пшеницы зеленым прочным. Была исследована активность глюкозо-6-фосфата, изоцитрата, малат- и алкогольдегидрогеназ, играющих важнейшую роль в пентозофосфатном шунте, а также в циклах Кребса и спиртового гликолиза.

Материал и методика. В экспериментах использованы следующие реактивы: глюкозо-6-фосфорная кислота, диатриевая соль, НАД, НАДФ, L-цистин солянокислый, набор реактивов для электрофореза (все фирмы Reanal), фенозин метасульфат (Sigma), нитротетразолиевый синий (Chemapol), а также зеленый прочный (Michrom). Эксперименты проводили на пшенице сорта Безостая 1 репродукция 1978 г.

Зародыши пшеницы изолировали и проверяли на жизнеспособность по методу Джонстона и Штерна [7], а также окрашиванием жизненно важных участков зародышей 1%-ным водным раствором хлористого тетразолия [5]. Обработку проводили в $5 \cdot 10^{-4}$ % растворе зеленого прочного, помещая в раствор семена на 16, 20 и 24 часа соответственно.

Для определения активности и изоферментного состава дегидрогеназ зародыши растирали на холоду в ступке с фарфоровым пестиком в среде для экстрагирования, содержащей 0,1 М трис-глициновый буфер, рН 8,3, 15%-ную сахарозу, 0,1%-ный цистин и 0,1%-ную аскорбиновую кислоту. Экстракцию проводили в малом объеме на магнитной мешалке в течение 45 мин при 4°. Экстракт просветляли центрифугированием в течение 20 мин при 30000 г, после чего определяли активность ферментов в супернатанте измерением изменения оптической плотности восстановленных НАД и НАДФ при 340 нм на спектрофотометре СФ-4А при 22°, используя различные инкубационные среды [1, 6].

Ферментативную активность препаратов рассчитывали по формуле

$$A = \frac{D}{1,2,07 \cdot C \cdot t}$$

где А—активность, D—изменение оптической плотности за время t в мин, а С—концентрация белка в мг. Концентрацию белка определяли по Лоури [8].

Электрофоретическое разделение изоферментов дегидрогеназ проводили по методу Сафроновых [4] в 7%-ном разделяющем геле, рН 8,9, и 2,5%-ном концентрирующем геле, рН 6,7, с использованием три-глицинового электродного буфера, рН 8,3. Разгонку белков проводили от анода к катоду при силе тока 5 ма на трубку и напряжении 500—600 вольт. В качестве метки использовали бромтимоловый синий.

Гели с изоферментами дегидрогеназ проявляли помещая в специальные инкубационные среды на 1,5 ч при 37° [1, 2], а денситометрирование проводили на сконструированном в лаборатории денситометре. Результаты изменения активности ферментов статистически обработаны.

Результаты и обсуждение. Как показали наблюдения, в первые 16 ч происходит увеличение активности алкогольдегидрогеназы, а в последующие 8 ч резкое снижение ее в изолированных зародышах пшеницы. В дальнейшем скорость падения активности фермента уменьшается и через 48 ч составляет 60% от начальной, или 45% от максимальной активности.

Необходимо отметить, что хотя кинетика изменения активности алкогольдегидрогеназы обработанных зародышей и не отличается от таковой контроля, однако падает она на большую величину, 48% от исходной активности и 39% от максимальной (вместо 60 и 45% у контроля соответственно).

Электрофорез показывает (рис. 1), что если в свежевыделенных зародышах обнаруживаются 4 изофермента алкогольдегидрогеназы, то в прорастающих наблюдается не только повышение активности фермента, но и увеличение количества изоферментов. После 16-часового проращивания активность алкогольдегидрогеназы достигает максимума, а количество изоферментов увеличивается до 6 (до 7 в контроле).

Сходная картина наблюдается также в изменении активности ма-

латдегидрогеназы. В первые 16 ч проращивания активность фермента возрастает более чем в три раза по сравнению с активностью в свежесыделенных зародышах. Однако начиная с 20-го часа активность малатдегидрогеназы начинает падать и через 48 ч снижается до уровня, превышающего уровень активности фермента в свежесыделенных зародышах только в 1,6 раз. Обработка зародышей зеленым прочным приводит к двукратному падению активности фермента по сравнению с контролем при 16—24-часовой обработке. В дальнейшем активность фермента в контрольных зародышах начинает интенсивно падать, а в обработанных—стабилизируется. Электрофорез показывает, что при проращении количество изоферментов малатдегидрогеназы возрастает (рис. 2). Однако, если в контроле оно увеличивается на 3, то в обработанных зародышах одна из этих фракций (четвертая) практически отсутствует, а две остальные менее выражены.

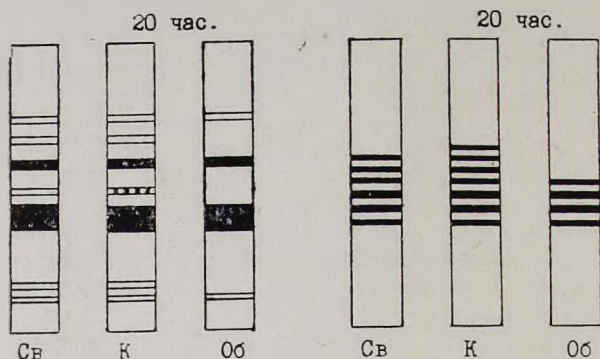


Рис. 1.

Рис. 1. Электрофореграммы изоферментов алкоголь- и малатдегидрогеназ в свежесыделенных, а также проращиваемых в течение 20 ч зародышах пшеницы. I—алкогольдегидрогеназа; II—малатдегидрогеназа; Св, К и Об—свежесыделенные, контрольные и обработанные зародыши пшеницы соответственно.

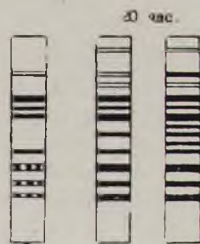


Рис. 2.

Рис. 2. Электрофореграммы изоферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в свежесыделенных, а также проращиваемых в течение 20 ч зародышах пшеницы. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Несколько иная картина наблюдается в изменении активности изоцитратдегидрогеназы. В процессе проращения в первые 16 ч отмечается интенсивное падение активности фермента и в дальнейшем она практически не меняется. Однако суммарный эффект оказывается довольно значительным, поскольку активность изоцитратдегидрогеназы при проращении уменьшается примерно в 5 раз по сравнению с таковой в свежесыделенных зародышах. Обработка зародышей зеленым прочным также сопровождается падением активности изоцитратдегидрогеназы, но с меньшей скоростью, а кинетика изменения активности становится практически линейной.

Через 48 ч проращивания активность изоцитратдегидрогеназы снижается до уровня, составляющего около 40% от активности в свежесыделенных зародышах, что примерно в 2 раза выше, чем в контроле. Ес-

ли через 16 ч активность изоцитратдегидрогеназы составляет 13, а через 48 ч—22% от активности в свежевыделенных зародышах, то после обработки зеленым прочным—76 и 40% соответственно.

В качестве ключевого фермента пентозофосфатного шунта представлялось интересным исследование изменения активности и изоферментного состава глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В первые 16 ч прорастания зародышей наблюдается увеличение активности фермента до 2 раз по сравнению с исходной. В интервале от 16 до 24 ч активность фермента не меняется, а после 24-часового прорастания она медленно падает, через 48 ч превышая уровень активности в свежевыделенных зародышах только на 20%. При обработке зеленым прочным в первые 16 ч активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы возрастает в 2,5 раза, в последующие 8 ч она продолжает возрастать, однако с меньшей скоростью. В дальнейшем наблюдается падение активности, которая через 48 ч составляет всего 170% от исходной. Необходимо отметить, что соотношение активностей фермента в обработанных зародышах и в контроле остается практически постоянным и варьирует в пределах 20—30%.

Итак, обработка зародышей зеленым прочным приводит либо к увеличению активности (или стабилизации), либо к частичному *de novo* синтезу фермента. Данное предположение подтверждается результатами электрофореза (рис. 2). Если в контрольных зародышах при прорастании появляются новые фракции, а количество наиболее подвижных изоферментов увеличивается, то в обработанных появляется 5 новых фракций и возрастает интенсивность окрашивания четырех других.

Таким образом, обработка зародышей зеленым прочным сильно отражается как на активности, так и на изоферментном составе дегидрогеназ. В одних случаях активность ферментов обработанных зародышей оказывается выше (изоцитрат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), а в других—ниже (малат- и алкогольдегидрогеназы), чем в контроле. Возрастание активности сопровождается появлением новых фракций изоэнзимов, а уменьшение—исчезновением некоторых фракций.

Полученные результаты подтверждают высокую биологическую активность зеленого прочного.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 29.X 1979 г.

**ԿԱՆԱԶ ԱՄՈՒՐՈՎ ՄՇԱԿՄԱՆ ՀԵՏԵՎԱՆՔՈՎ ՑՈՐԵՆԻ ՍԱՂՄՈՒՄ
ՈՐՈՇ ԴԵԶԻԳՐՈԳԵՆԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ԵՎ ԻԶՈՑԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԲԱՂԱԳՐՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒՄԸ
Ս. Գ. ՏԻՐԱՑՈՒՅԱՆ, Հ. Ռ. ՎԱՐԿԱԳԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՅԱՆ**

Հոդվածում ցույց է տրվում, որ ցորենի առանձնացված սաղմի մշակումը կանաչ ամբրի $5 \cdot 10^{-4}\%$ լուծույթով հանգեցնում է մի շարք դեհիդրոգենազների ակտիվությունների փոփոխման: Իզոցիտրատ- և գլյուկոզա-6-ֆոսֆատ

դեհիդրոգենազների ակտիվություններն աճում են ցորենի սաղմը մշակելուց հետո, իսկ մալաթ և ալկոհոլդեհիդրոգենազների ակտիվություններն ընկնում են: Ֆերմենտների ակտիվությունների աճը և նվազումը ուղեկցվում են համապատասխան ֆերմենտների իզոֆերմենտների քանակի ավելացումով և պակասումով: Ստացված տվյալներն ապացուցում են կանաչ ամուրի բարձր կենսաբանական ակտիվության փաստը:

CHANGES OF THE ACTIVITY AND ISOENZYME PATTERNS OF SOME DEHYDROGENASES AFTER TREATMENT OF ISOLATED WHEAT GERMS WITH FAST GREEN

S. G. TIRATSUYAN, R. R. VARDAPETYAN, G. H. PANOSYAN

It has been shown, that the treatment of isolated wheat germs with $5 \cdot 10^{-4}$ % solution of the fast green leads to considerable changes of the activity of some dehydrogenases. The isocitrate and glucoso-phosphate dehydrogenase activities are increasing, while the alcohol and malate dehydrogenase activities of the treated germs are decreasing. The increase and decrease of the activities are accompanied with the appearance and disappearance of some isoenzyme dehydrogenase patterns. Results obtained prove a high biological activity of fast green.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Красноок Н. П., Моргунова Е. А., Вишнякова И. А., Поварова Р. И. Физиол. раст., 23, 8, 1976.
2. Паносян Г. А., Тамразян Е. Е. Биолог. ж. Армении, 24, 12, 1971.
3. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Физиол. раст., 16, 2, 1969.
4. Тирацунян С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 33, 1980.
5. Фирсова М. К. В кн. Жизнеспособность семян, М, 1978.
6. Шутова Е. А., Баллод З. И., Андрод А. И., Кретович В. Л. Прикладная биохимия и микробиология, 9, 2, 1973.
7. Gaspar T., Khan A. A., Fries D. Plant Physiol., 51, 145—149, 1973.
8. Gaspar T. Xhaufflaire. Planta, 72, 252—257, 1967.
9. Jonson F. B., Stern H. Nature (Lond), 179, 160—161, 1959.
10. Lowry O. U., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem, 193, 265—275, 1951.
11. Singh R., Singh D. Biochem. Physiol. Pflanzen, 166, 5, 233—237, 1974.