

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА
ПЕРОКСИДАЗ ПРИ ОБРАБОТКЕ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ
ЗЕЛЕНЫМ ПРОЧНЫМ

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

Проведенные эксперименты выявили сильное увеличение активности и изоферментного состава пероксидаз при обработке зародышей пшеницы зеленым прочным. Предполагается, что обработка этим красителем приводит к более быстрому включению циклов аэробного дыхания, что может лежать в основе его действия как стимулятора.

Ключевые слова: зеленый прочный, пероксидаза, изоферменты.

С целью выяснения механизма стимулирующего действия некоторых красителей, обнаруживаемого при предпосевной обработке семян различных растений [2], ранее нами изучалось действие зеленого прочного на различные дегидрогеназные системы зародышей пшеницы. Установлено, что обработка зародышей пшеницы этим красителем приводит к возрастанию активности и изменению изоферментного состава глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [4].

Поскольку увеличение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ посредством системы аэробных дегидрогеназ может стимулировать активацию оксидаз, в частности пероксидаз, то представляло определенный интерес исследование активности и изоферментного состава последних при обработке зародышей пшеницы зеленым прочным.

Материал и методика. В экспериментах использовали пирогаллол и бензидин (Сметарол), зеленый прочный (Michrom), а также набор реактивов для электрофореза в ПААГ (Reanal). Объектом исследований служили семена пшеницы сорта Безостая I репродукции 1978 г. Зародыши проращивали на фильтровальной бумаге в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ % раствора зеленого прочного в течение 16, 20, 24 и 48 часов.

Изолирование зародышей и проверка их жизнеспособности проводились по методу Джонстона [9], а также обработкой 1%-ным водным раствором хлористого тетразола [5].

Для определения активности и изоферментного состава пероксидазы зародыш гомогенизировали растиранием в ступке с фарфоровым пестиком на холоду в среде для экстрагирования, содержащей 0,006 М фосфатный буфер, pH 6,8. Экстракцию проводили в течение 30 мин при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке в условиях холода. Активность ферментов в экстракте определяли после предварительного просветления центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин по изменению оптической плотности при 430 нм на спектрофотометре СФ-4а по известному методу [8]. Концентрацию белка в экстракте определяли по методу Лоури [10]. Изоферменты пероксидазы после электрофореза выявляли, помещая гели в инкубационные среды,

содержащие 5 мМ бензидина или 2 мМ пирагаллола [3]. После 30 мин инкубации при 37° гели проявляли в 0,002%-ном растворе H_2O_2 в течение 1 мин. Денситометрирование гелей проводили на сконструированном в лаборатории денситометре.

Результаты, приведенные на рисунках, статистически обработаны из результатов 10—12 экспериментов. Приведено также среднеквадратическое отклонение.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены результаты изменения активности пероксидазы при набухании и прорастании пшеничных зародышей как в контрольной среде, содержащей 0,01 М КСl и 0,01М CaCl₂, так и при обработке $5 \cdot 10^{-4}$ % раствором зеленого прочного. Как видно из рисунка, в контрольных образцах в течение первых 16-ти ч замачивания наблюдается лишь незначительный прирост активности, в дальнейшем, к 20-му часу он несколько увеличивается, а после 24-часового прорастания активность резко возрастает и достигает величины, в 7 раз превышающей аналогичный показатель в свежесделанных зародышах. В последующие 24 ч активность пероксидазы продолжает возрастать, однако с меньшей скоростью и достигает величины, превышающей начальную активность в 11 раз. Максимальное увеличение активности пероксидазы в интервале 20—24 ч объясняется включением аэробного цикла дыхания зародышей.

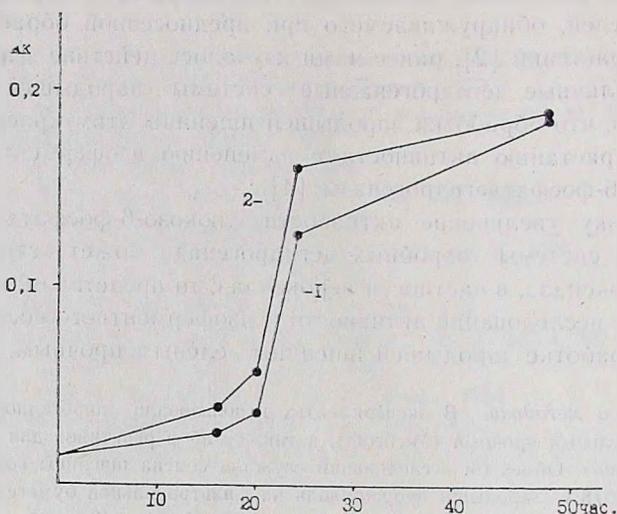


Рис. 1. Изменение активности пероксидазы в процессе прорастания изолированных зародышей пшеницы. 1 и 2—активность пероксидазы в контроле и при обработке соответственно.

Максимальная разница между активностями пероксидаз обработанных и контрольных зародышей наблюдается в интервале 16—20 ч, где их соотношение равно 1,54. В последующие 4 ч это соотношение уменьшается до 1,27, а через 48 ч практически исчезает (рис. 1). Приведенные результаты позволяют предполагать, что зеленый прочный, не влияя на конечную активность, резко ускоряет активирование перо-

ксидазы, способствуя тем самым более быстрому включению аэробных циклов дыхания.

Литературные данные свидетельствуют о том, что увеличение активности пероксидазы при прорастании сухого семени пшеницы сопровождается закономерным увеличением количества ее изоэнзимов [11]. Сравнение электрофореграмм изоэнзимов пероксидаз контрольных и обработанных зародышей, выявляемых бензидином, показало возрастание числа изоэнзимов от I в сухих до 15 в замоченных (48 ч) зародышах (рис. 2).

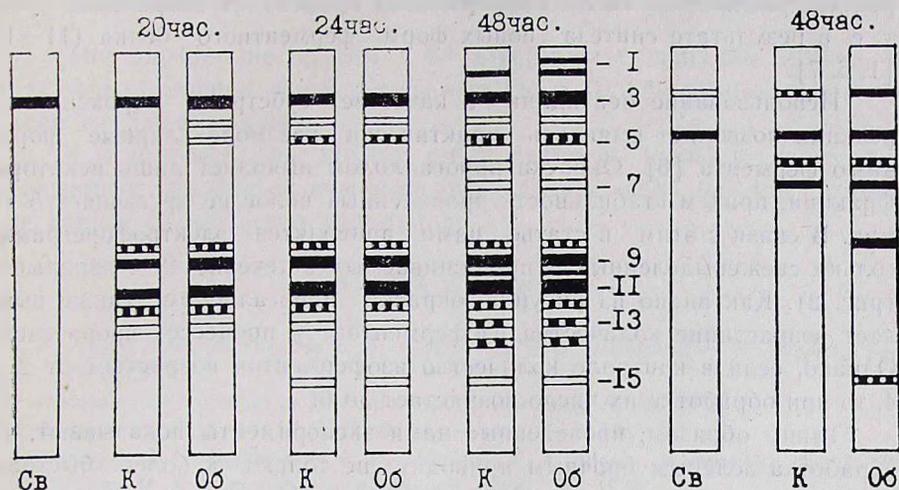


Рис. 2. Электрофореграммы изоферментов пероксидазы в разные часы проращивания изолированных зародышей пшеницы. Окрашивание проводилось как бензидином, так и пирогаллолом. Св, К и Об—свежевыделенные, контрольные и обработанные зародыши пшеницы соответственно.

В обрабатываемых в течение 16 ч зародышах число изоэнзимных полос пероксидазы по сравнению с контролем не увеличивается, но наблюдается повышение интенсивности окрашивания и возрастание активностей полос 3, 9 и 11. После 20-часовой обработки появляются две изоферментные полосы малой подвижности и слабой интенсивности (4 и 5), которые отсутствуют в контроле. В последующие 4 ч количество изоэнзимных компонентов пероксидаз в обработанных и необработанных зародышах одинаково, однако наблюдается большая активность и более интенсивное окрашивание полос 3 и 11 в обработанных (рис. 2).

Необходимо отметить практически полное сходство между изоферментными составами пероксидаз, полученных при прорастании контрольных и обработанных в течение 20 и 24 ч зародышей, за исключением полос 5 и 15. Выявленная картина подтверждает наше предположение о катализирующем действии зеленого прочного на включение циклов аэробного дыхания.

После 48 ч проращивания различия в изоферментном составе пе-

роксидаз не наблюдается, если не считать появления малоподвижной фракции I в последних. Можно полагать, что с жизненно важными физиологическими процессами семян в начале прорастания особенно тесно связаны фракции со средней подвижностью (8—13), а в более поздние сроки—с малой подвижностью. Обработка зародышей зеленым прочным в начале прорастания в первые 16 ч приводит к возрастанию активности фермента за счет увеличения количества среднеподвижных фракций изоферментов, а в дальнейшем—за счет более раннего появления изоферментов малой подвижности по сравнению с контролем. Вероятно, увеличение числа изоферментов происходит вторичным путем, т. е. в результате синтеза новых форм ферментного белка (11—13) [1, 6, 7].

Использование бензидина в качестве субстрата пероксидазной реакции позволяет выявлять практически все молекулярные формы этого фермента [6]. Окраска пирогаллолом выявляет лишь некоторые фракции, причем стабильность проявленных полос не превышает 5—10 мин. В связи с этим в статье нами приводятся электрофореграммы только свежeweделенных и проращиваемых в течение 48 ч зародышей (рис. 2). Как видно из рисунка, окраска пирогаллолом также выявляет возрастание количества изоферментов в процессе прорастания. Однако, если в контроле количество изоферментов возрастает от 2 до 4, то при обработке их число возрастает до 6.

Таким образом, проведенные нами эксперименты показывают, что обработка зеленым прочным приводит не только к более быстрому возрастанию активности пероксидазы в процессе прорастания, но и к более раннему появлению некоторых ее изоферментов. Эффект более быстрого включения циклов аэробного дыхания приводит к увеличению жизнеспособности семян и может лежать в основе стимулирующего действия зеленого прочного.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 10.IX 1980 г.

**ՊԵՐՈՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ՊԵՐՈՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒՄԸ**

Ս. Գ. ՏԻՐԱՅՈՒՅԱՆ, Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

*Հոդվածում ցույց է տրված, որ ցորենի առանձնացված սաղմի մշակու-
մը կանաչ ամուրի լուծույթով հանգեցնում է մի շարք դեհիդրոգենազների
ակտիվության աճին: Գլյուկոզա-6-ֆոսֆատ դեհիդրոգենազի ակտիվության
ավելացումը աէրոբ դեհիդրոգենազների սխտեմի միջնորդությամբ խթա-
նում է օքսիդազների ակտիվությունն ընդհանրապես և պերօքսիդազի ակտի-
վությունը՝ մասնավորապես: Կատարված փորձերը ցույց տվեցին, որ կանաչ
ամուրի լուծույթով մշակված ցորենի սաղմում բավական ուժեղ աճում են
պերօքսիդազի ակտիվությունը և իզոֆերմենտների քանակը:*

Ննթադրվում է, որ կանաչ ամուրով ճշակման հետևանքով արագանում է ակրոբ շնչառության սիստեմի միացումը, որով և կարելի է բացատրել սովյալ ներկանյութի խթանիչ ազդեցությունը:

CHANGES OF THE ACTIVITY AND ISOENZYME PATTERN OF PEROXIDASES UNDER THE TREATMENT OF ISOLATED WHEAT GERMS WITH THE FAST GREEN

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

The considerable increase of isoperoxidase activities under the treatment of isolated wheat germs with the $5 \cdot 10^{-4}$ % solution of the fast green has been revealed.

It is supposed, that the fast green treatment loads to more rapid inclusion of the aerobic espiration cycles which may be the probable mechanism of fast green stimulation.

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. Сафаров В. И., Сафонов М. П. Физиол. раст., 16, 2, 1969.
4. Тирацунян С. Г., Вардапетян Р. Р., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 33, 11, 1980.
5. Фирсова М. К. В кн.: Жизнеспособность семян. М., 1978.
6. Шутова Е. А., Баллод З. И., Анрод А. И., Кретович В. Л. Прикладная биохимия и микробиология. 9, 2, 1973.
7. Gaspar T. H., Khan A. A., Fries D. Plant Physiol., 51, 146—149, 1973.
8. Gaspar T. H., Xhaufflaire A. Planta, 72, 252—257, 1967.
9. Jonston 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.