

ВИЛЬВЕ ЯАСКА

### ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА ИЗОФЕРМЕНТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ ПШЕНИЦЫ

Упорядоченная в пространстве и времени реализация генетической информации для становления организма со строго отрегулированной структурной и функциональной организацией клеток проходит в условиях воздействия ряда внешних и внутренних факторов. В свете современных представлений о возможной связи механизма действия фитогормонов и близких к ним по эффекту соединений с нуклеиновым и белковым обменом (Key, Shannon, 1964; Nooden, Thimann, 1963, 1965; Penny, Galston, 1966; Masuda, 1969 и др.) можно рассматривать эти физиологически активные ростовые вещества как одни из химических факторов, контролирующих протекание составных процессов онтогенеза.

В настоящей работе изучалось действие некоторых ростовых веществ — 3-индолилуксусной кислоты (ИУК), 1-нафтилуксусной кислоты (НУК), кинетина и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) — на изоферменты пероксидазы пшеницы при прорастании. Между скоростью роста и активностью пероксидазы во многих случаях отмечена определенная взаимосвязь — скорость роста часто обратно пропорциональна активности фермента (Kamerbeek, 1956; McCune, Galston, 1959; Evans, Alldridge, 1965). Пероксидаза во многих растениях трудно отделима от оксидазы индолилуксусной кислоты (Galston и др., 1953; Shin, Nakamura, 1962; Bastin, 1964 и др.), хотя идентичность обоих ферментов наблюдается не всегда (Sequeira, Mineo, 1966; Yoneda, Endo, 1970). Кроме того, пероксидазу можно считать удобным объектом для изучения воздействия ростовых веществ, потому что набор изоферментов пероксидазы при прорастании подвергается значительным качественным изменениям (Macko и др., 1967; Bhatia, Nilson, 1969; Alexandrescu, Hagima-Călin, 1970; Austine и др., 1970 и др.).

#### Материал и методика

Семена гексаплоидной яровой пшеницы 'Пиккер' прорастивались в темноте при  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  в чашках Коха на листах фильтровальной бумаги, смоченных 10 мл дистиллированной воды (контроль) или 10 мл растворами ИУК (в концентрации  $2 \times 10^{-5}$  М;  $1 \times 10^{-4}$  М и  $1 \times 10^{-3}$  М), НУК ( $4 \times 10^{-5}$  М), кинетина ( $2 \times 10^{-5}$  М), смеси ИУК и кинетина (соответственно  $2 \times 10^{-5}$  М и  $10^{-5}$  М) или 2,4-Д ( $2 \times 10^{-5}$  М;  $1 \times 10^{-4}$  М и  $1 \times 10^{-3}$  М). Для изготовления начальных концентрированных растворов ( $10^{-2}$  М) соответствующие соединения растворяли в небольшом объеме этилового спирта (ИУК, НУК) или диметилформамида (кинетин), а затем разбавляли водой. Растворы 2,4-Д изготовлялись, применяя для нейтрализации NaOH.



Все растворы, используемые для проращивания, на следующий день заменялись свежими (2 мл). В некоторых опытах семена проращивались на растворах хлорамфеникола (50 мг/л), актиномицина Д (20 мг/л) или на  $10^{-4}$  М растворе 2,4-Д, содержащем актиномицин Д (20 мг/л). В последнем случае семена пшеницы проращивались в течение 25 ч в присутствии только актиномицина Д (20 мг/л), а затем переводились на 47 ч в среду, содержащую  $10^{-4}$  М 2,4-Д и актиномицин Д (20 мг/л).

Зародыши из непроросших семян выделялись после их 18-часового замачивания в дистиллированной воде при 2°.

Изолированные 18—19-часовые зародыши пшеницы, а в последующем также и проростки (щиток, корешки, колеоптили с первым листом), промывались дистиллированной водой и гомогенизировались на холоде буферной смесью, состоящей из 0,05 М трис-оксиметиламинометана (трис), 0,035 М аскорбиновой кислоты, 0,001 М ЕДТА- $\text{Na}_2\text{Mg}$  и 0,002 М  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (в соотношении 10—25 зародышей или 6—8 проростков на 1,5 мл буферной смеси). Гомогенаты центрифугировались в рефрижераторной центрифуге при 18 000 г в течение 20 мин. Надосадочная жидкость сливалась в пробирки, содержащие 40 мг сефадекса Г-200 и 150 мг сахарозы, и хранилась в замороженном виде.

Изготовление гелей и электрофорез белков в анионной системе проводились согласно видоизмененной методике Б. Дэвиса (Davis, 1964), описанной нами ранее (Jaaska, Jaaska, 1969). Гели для фракционирования в катионной системе содержали акриламида 8%, N,N'-метиленабисакриламида 0,16%, ЕДТА 0,004 М, LiOH 0,15 М,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,35 М и рибофлавина 0,8 мг%. В качестве катодного буфера использовалась 4%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Анодный буфер состоял из 0,08 М  $\beta$ -аланина и 0,01 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

Для выявления пероксидазной активности гели инкубировались в течение 20 мин в 20 мл смеси 0,001 М о-данизидингидрохлорида и 0,001 М пирокатехина в 0,2 М ацетатном буфере (рН 3,6), куда затем добавляли 0,4 мл 1,5%-ной  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Результаты исследований

Как видно из энзимограммы 1 (рис. 1А), у зародышей пшеницы после 18-часового прорастания при 25° в дистиллированной воде (контроль) в случае анодной системы фракционирования обнаруживаются 2—3 малоподвижные диффузные фракции и две основные дискретные фракции пероксидазы со средней электрофоретической подвижностью. Пероксидазная активность остается в зародышах после 18-часового проращивания на весьма низком уровне, и четкие зоны выявляются в геле лишь при использовании для электрофореза достаточно большого количества концентрированного белкового экстракта.

При коротких сроках инкубирования гелей в реакционной смеси или при использовании для электрофореза меньшего количества экстракта появляются лишь две малоинтенсивные фракции со средней подвижностью (рис. 1А 2). Присутствие в среде проращивания изучаемых ростовых веществ (ИУК, НУК, 2,4-Д, кинетин) в испытываемых концентрациях на данном этапе роста зародыша на изоферментном составе пероксидазы не сказывается, как показано на рис. 1А 3 для  $10^{-4}$  М ИУК.

В зародышах непроросших семян, которые выдерживались в течение 18 ч в дистиллированной воде при 2°, были выявлены (см. рис. 1А 4) те же основные изоферменты со средней электрофоретической подвижностью, что и в проросших при 25° зародышах. Некоторые различия между ними отмечаются в изоферментах, расположенных в верхней части геля.

Как видно из рис. 1Б 1, к 23,5 часам проращивания в зародышах выявляются новые быстро движущиеся зоны активности и ослабевают ранее доминирующие две фракции со средней подвижностью. Некоторые менее четкие изменения можно отметить и в малоподвижных фракциях пероксидазы. К этому времени начинает сказываться и действие



ростовых веществ. Как можно убедиться на примере с  $10^{-4}$  М ИУК и  $10^{-4}$  М 2,4-Д (рис. 1В 2, 3), эти физиологически активные вещества препятствуют развитию активности наиболее быстродвижущейся новой фракции (или фракций), которая к этому времени проявляется у контроля. То же можно сказать о действии  $4 \times 10^{-5}$  М НУК.

В отличие от электроотрицательных пероксидаз, движущихся к аноду, при катионной системе электрофореза после 18 ч проращивания обнаруживается целый комплекс высокоактивных изоферментов (рис. 1В 1), состав которого не зависит от характера использованного ростового вещества (рис. 1В 2, 3). Тот же триплет изоферментов выявляется уже в непроросших семенах (рис. 1В 4). При фракционировании большего количества гомогената или увеличении времени инкубации гелей наряду с расплывшимся триплетом быстродвижущихся пероксидаз на всех энзимogramмах появляются и некоторые менее активные зоны (рис. 1В 5).

На рис. 2А приведены электрофореграммы электроотрицательно заряженных пероксидаз проростков после 42-часового проращивания в присутствии различных концентраций ИУК. При этом ИУК в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М, а особенно  $2 \times 10^{-5}$  М, значительно содействовала развитию боковых корешков. Рост корней и колеоптилей подавлялся с повышением концентрации ауксина. Усиленное корнеобразование, а также некоторое разрастание основания колеоптиля, отмечалось и при применении НУК. Кинетин ( $2 \times 10^{-5}$  М) видимых отклонений в ходе роста и развития не вызывал. Наивысшая доза ИУК ( $10^{-3}$  М) оказалась для развития проростков в значительной мере ингибирующей.

В 42-часовых молодых проростках обнаруживаются (рис. 2А 1, контроль) уже все основные анодные изоферменты пероксидазы, которые имеются и в более старых проростках (см. рис. 2В 1). Два изофермента со средней подвижностью, доминирующие в зародышах, едва заметны на энзимogramмах проростков и выявляются лишь после более продолжительного инкубирования гелей в реакционной смеси. Под действием ИУК на энзимogramме проростков этого периода отмечается некоторое перераспределение активностей изоферментов со средней электрофоретической подвижностью (рис. 2А, 2, 3). Одновременно выявляются наиболее быстродвижущиеся пероксидазы, образование которых до этого (рис. 1В 2) было полностью подавлено ауксином (рис. 2А 2, 3), однако по интенсивности, и, возможно, по числу изоферментов они уступают контролю (рис. 2А 1). Присутствие  $4 \times 10^{-5}$  М НУК также снижало образование наиболее быстродвижущихся зон пероксидазы. Кинетин в явной форме подобного действия не оказывал. Смесь кинетина ( $10^{-5}$  М) и НУК ( $2 \times 10^{-5}$  М) дала картину изоферментов, характерную для кинетина и в общих чертах сходную с контролем. Наивысшая доза ИУК ( $10^{-3}$  М) в значительной мере ингибировала рост и развитие зародышей. Соответственно было сильно подавлено и появление ряда изоферментов (рис. 2А 4) по сравнению с контролем.

При катионной системе электрофореза на энзимogramме контроля (рис. 2В 1) после 42 ч роста обнаруживается ряд новых основных фракций изоферментов, отсутствующих в 18-часовых зародышах (рис. 1В 1). Присутствие в среде проращивания ИУК в зависимости от концентрации в большей или меньшей мере задерживает появление новых фракций изоферментов (рис. 2В 2—4). Следует отметить, что при использовании для электрофореза большего количества гомогената или при удлинении времени инкубации на энзимogramмах (рис. 2В 2—3) дополнительно выявляются и некоторые из относительно менее подвижных новых фрак-



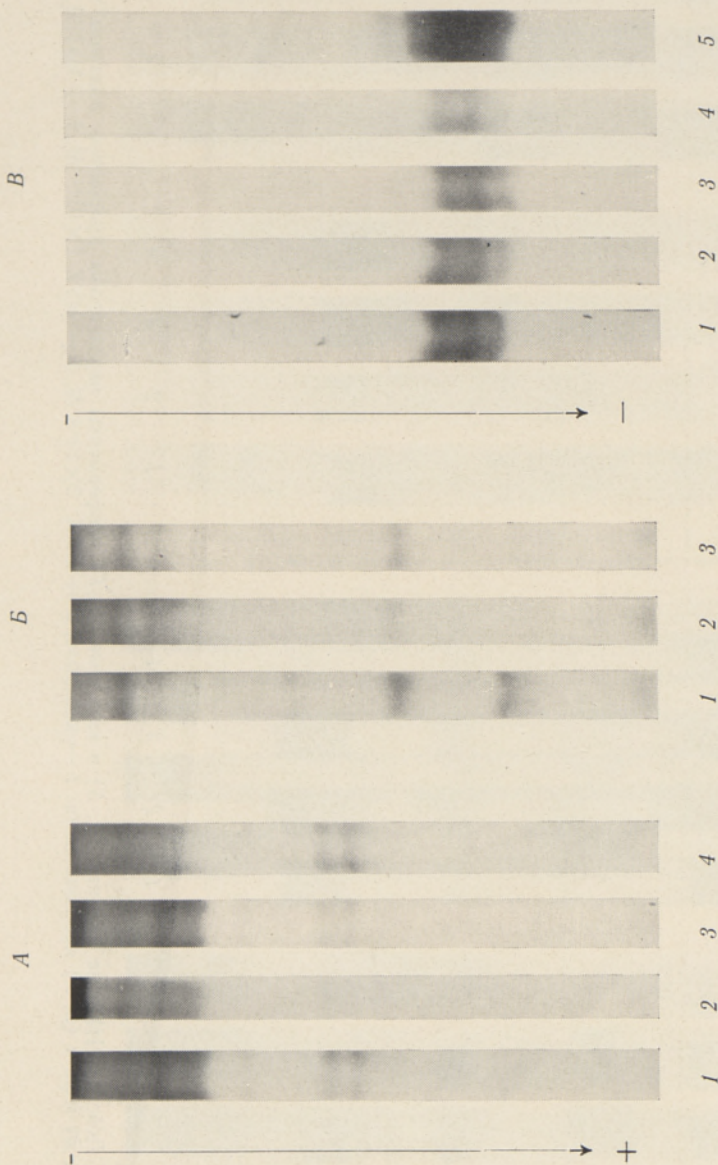


Рис. 1. Изоферменты пероксидазы зародышей пшеницы на начальных этапах опыта.

*A* — анодные изоферменты пероксидазы после 18 ч проращивания: 1 — контроль, 2 — то же с меньшим количеством экстракта, 3 — ИУЖ  $1 \times 10^{-4}$  М, 4 — изоферменты непроросших зародышей (18 ч при  $2^\circ\text{C}$ ).

*B* — анодные изоферменты пероксидазы после 23,5 ч проращивания: 1 — контроль, 2 — ИУЖ  $1 \times 10^{-6}$  М, 3 — 2,4-Д  $1 \times 10^{-4}$  М.

*B* — катодные изоферменты после 18 ч проращивания: 1 — контроль, 2 — ИУЖ  $1 \times 10^{-4}$  М, 3 — 2,4-Д  $1 \times 10^{-4}$  М, 4 — изоферменты непроросших зародышей (18 ч при  $2^\circ\text{C}$ ), 5 — контроль с большим количеством экстракта.

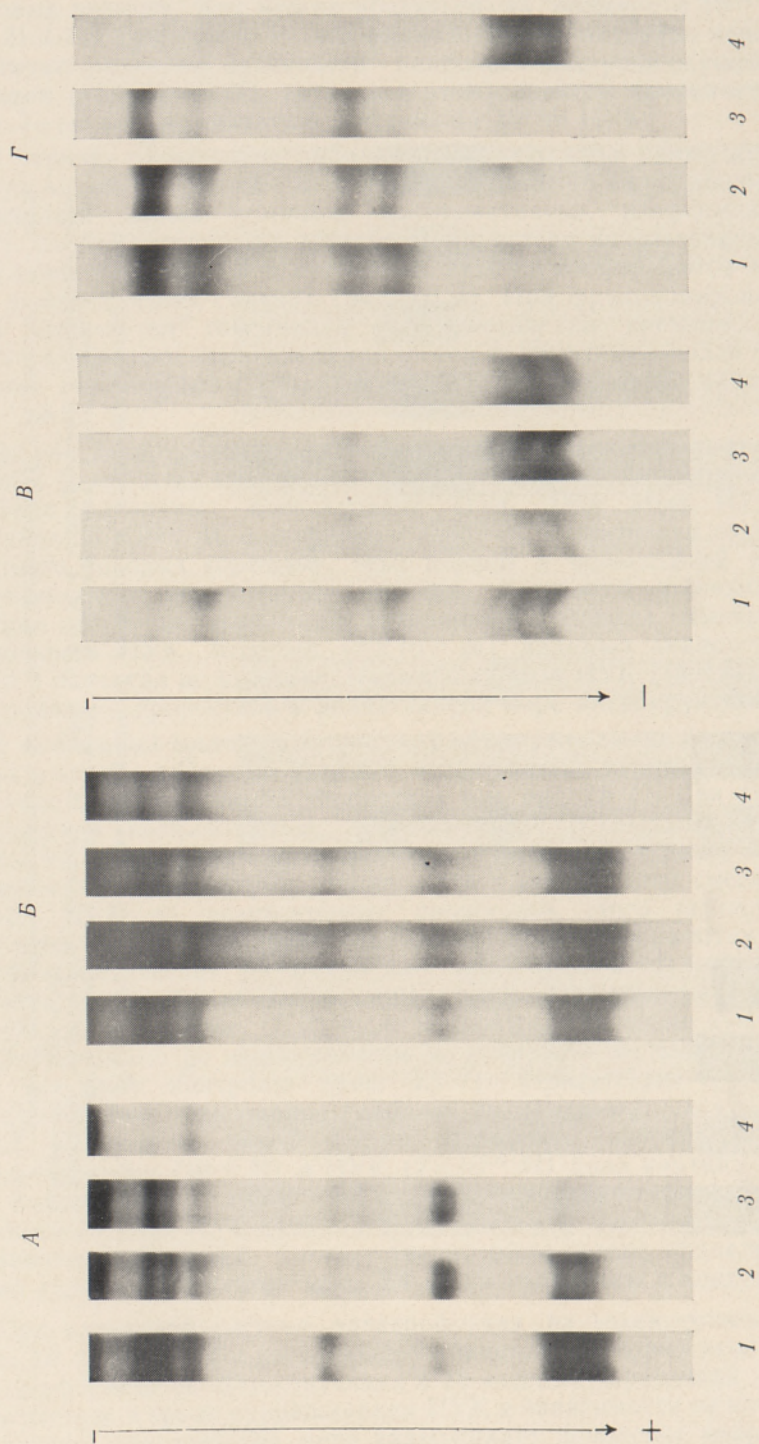


Рис. 2. Действие ИУК на анодные (А, В) и катодные (В, Г) изоферменты пероксидазы проростков пшеницы после 42 ч (А, В) и 66 ч (Б, Г) проращивания: 1 — контроль, 2 — ИУК  $2 \times 10^{-5}$  М, 3 — ИУК  $1 \times 10^{-4}$  М, 4 — ИУК  $1 \times 10^{-3}$  М.



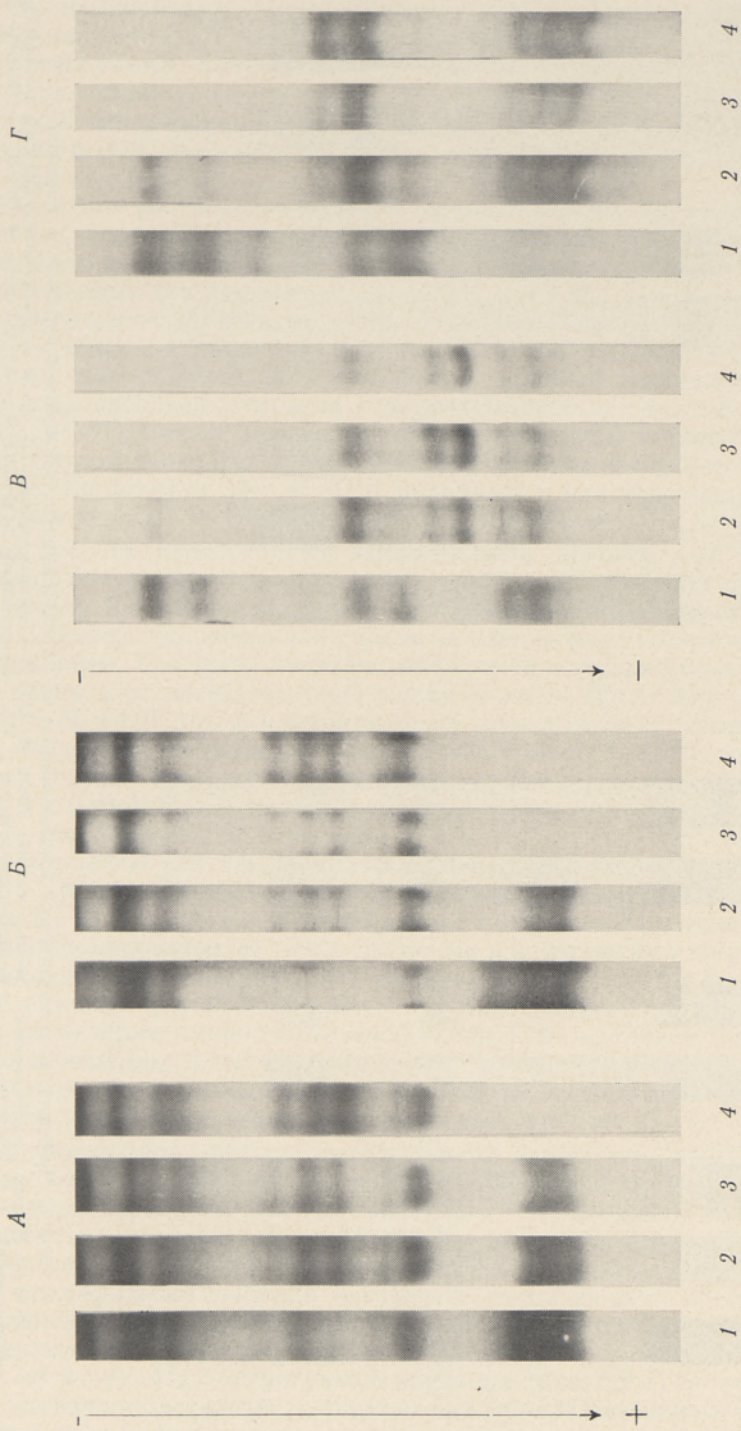


Рис. 3. Действие 2,4-Д на анодные (А, Б) и катодные (В, Г) изоферменты пероксидазы проростков пшеницы после 42 ч (А, В) и 66 ч (Б, Г) проращивания: 1 — контроль, 2 — 2,4-Д  $1 \times 10^{-5}$  М, 3 — 2,4-Д  $1 \times 10^{-4}$  М, 4 — 2,4-Д  $1 \times 10^{-3}$  М.

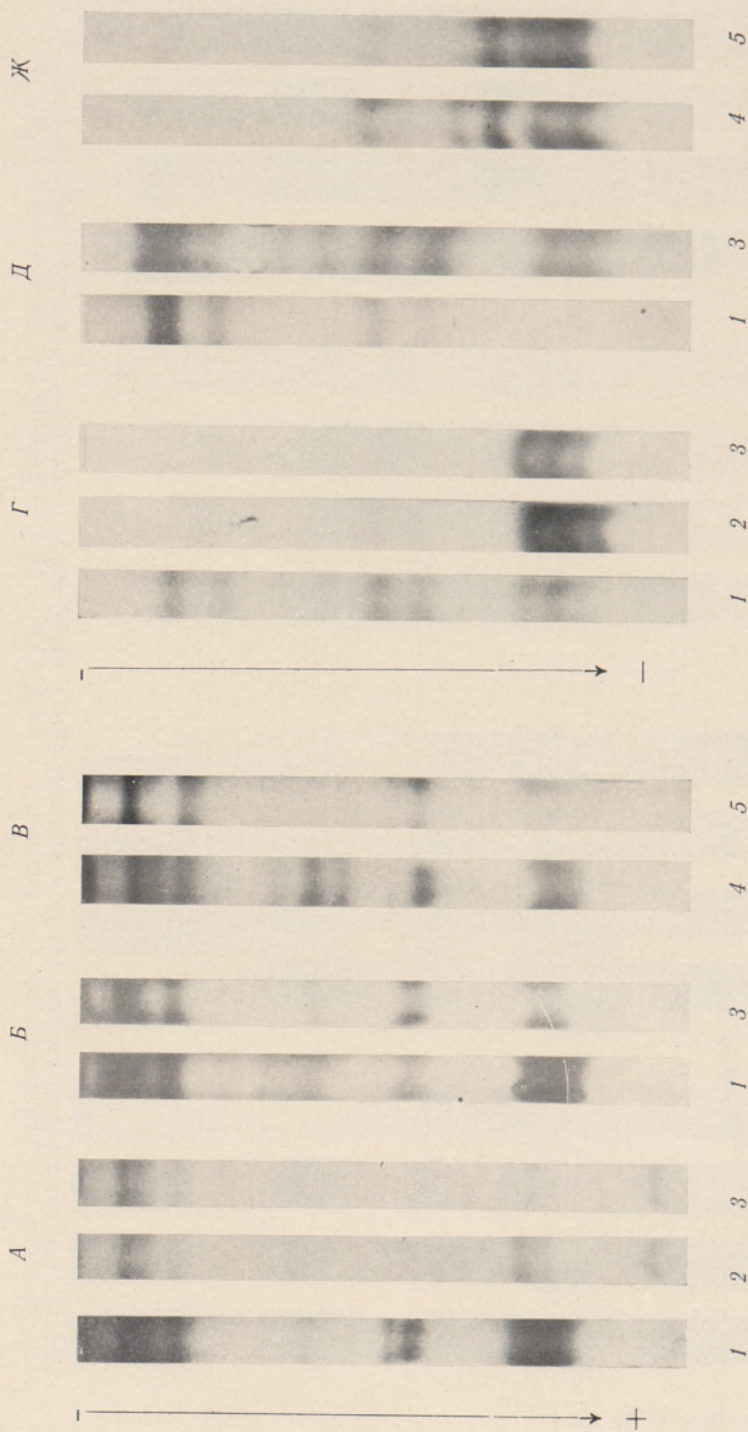


Рис. 4. Действие хлорамфеникола и актиномицина Д на изоферменты пероксидазы проростков пшеницы.

А, Б, В — анодные изоферменты соответственно после 43, 92 и 72 ч проращивания; Г, Д, Ж — соответствующие им катодные изоферменты: 1 — контроль, 2 — хлорамфеникол 50 мг/л, 3 — актиномицин Д 20 мг/л, 4 — 2,4-Д 1×10<sup>-4</sup> М (42 ч), 5 — актиномицин Д 20 мг/л (25 ч) → актиномицин Д 20 мг/л + 2,4-Д 1×10<sup>-4</sup> М (47 ч).



ций, что, по-видимому, свидетельствует о значительном, однако неполном подавлении синтеза этих изоферментов ауксином.

Энзимограмма, полученная в результате воздействия НУК, в большой мере сходна с таковой при  $2 \times 10^{-5}$  М ИУК (рис. 2В 2). Кинетин появлению менее подвижных верхних фракций не препятствовал, а смесь кинетина и НУК дала энзимограмму, свойственную только одному кинетину или контролю.

После 66 ч роста ингибирующее влияние ауксина на активность наиболее быстродвижущихся к аноду зон пероксидазы в значительной мере сглаживается (рис. 2Б 1—3) и сильное ингибирующее действие обнаруживается лишь при наивысшей дозе ИУК ( $10^{-3}$  М). В катионной системе изоферментов на этом этапе роста наблюдается повышение интенсивности некоторых зон в верхней части геля и общее снижение интенсивности наиболее быстродвижущегося триплета, высокая активность которого была в предыдущем отмечена у меристематических тканей. Как видно из рис. 2Г 4, а также уже из рис. 2В 3—4, высокие концентрации ИУК препятствуют снижению активности быстродвижущегося триплета пероксидаз. Кроме того,  $10^{-3}$  М ИУК подавляет и ряд пероксидаз, расположенных в верхней и средней части энзимограммы.

На рис. 3А представлены энзимограммы пероксидазы, полученные при воздействии различных концентраций 2,4-Д после 42 ч роста. К этому времени все применяемые дозы 2,4-Д индуцировали обильное каллусообразование, одновременно сильно подавляя рост coleoptилей, а особенно корней. Как было показано выше, к 18 ч прорастания 2,4-Д никакого эффекта на изоферментный состав не имел. После 23,5 ч выявилось, что  $10^{-4}$  М 2,4-Д при анионной системе электрофореза задерживал проявление активности наиболее быстродвижущихся зон. На данном этапе роста (после 42 ч) эти зоны выявляются как в присутствии  $2 \times 10^{-5}$  М, так и  $1 \times 10^{-4}$  М 2,4-Д, однако по интенсивности (а, возможно, и по составу) они уступают контролю (рис. 3А 1—3). Наивысшая концентрация 2,4-Д ( $10^{-3}$  М) полностью подавляла появление этих зон (рис. 3А 4). Кроме вышесказанного эффекта, в общих чертах сходного действию ИУК и НУК, все концентрации 2,4-Д специфически повышали активность некоторых из менее активных в контрольных проростках зон, расположенных в средней части энзимограммы (рис. 3А 2—4). Отдельными опытами было установлено, что выявившиеся триплеты пероксидазы характерны именно каллусной ткани. Одновременно, в зависимости от концентрации 2,4-Д и количества фракционируемого гомогената, в большей или меньшей степени проявляется подавление одной из двух наименее подвижных фракций пероксидаз (рис. 3А 4).

При катионной системе электрофореза выявилось, что 2,4-Д в различных концентрациях подавляет в 42-часовых проростках появление ряда менее подвижных фракций (рис. 3В 2—4), которые к этому времени выявляются у контроля (рис. 3В 1). Эта сторона действия 2,4-Д сходна с эффектом ранее рассмотренных ИУК и НУК. Наряду с этим 2,4-Д специфически снижала активность одной из двух преобладающих в контроле средних зон пероксидазы и инициировала активность двух высокоактивных изоферментов, расположенных над нижним триплетом (рис. 3В 2—4). На энзимограмме контроля (рис. 3В 1) в этом участке геля активность отсутствует, однако при продолжительном инкубировании там явно выявляется только одна зона.

Проращивание пшеницы в течение 66 ч не приводит к дальнейшему существенному изменению состава изоферментов в анионной системе по сравнению с общей картиной после 42 ч роста — все применяемые дозы 2,4-Д вызывают в большей или меньшей мере подавление самых нижних



изоферментов, а также одного из наименее подвижных в верхней части геля и индуцируют появление двух из трех характерных для каллуса пероксидаз в средней части энзимограммы (рис. 3Б 2—4).

В отличие от электроотрицательно заряженных анодных пероксидаз катодные изоферменты 66-часовых проростков, выращенных в присутствии 2,4-Д, претерпевают по сравнению с изоферментами 42-часовых проростков (рис. 3В) дальнейшие изменения (рис. 3Г). Помимо подавления изоферментов, расположенных в верхней части геля, и сохранения активности наиболее быстрых, все используемые концентрации 2,4-Д вызывали определенное перераспределение относительной активности изоферментов в средней части энзимограммы (рис. 3Г 2—4). На энзимограмме проростков, выращенных в присутствии  $2 \times 10^{-5}$  М 2,4-Д, начинают обнаруживаться некоторые из верхних менее подвижных зон, ранее ингибированных в 42-часовых проростках.

Кроме действия ростовых веществ, в ряде опытов исследовалось влияние некоторых ингибиторов транскрипции ДНК и трансляции РНК на развитие пероксидазной активности. На рис. 4А и Б приведены энзимограммы пероксидазы, полученные в результате 43 и 92 ч прорастания семян в присутствии 20 мг/л актиномицина Д или 50 мг/л хлорамфеникола. Оба ингибитора сильно подавляли рост и развитие зародышей. Как можно убедиться, применяемые ингибиторы не вызывали существенных качественных сдвигов в составе анодных пероксидаз, хотя, особенно при актиномицине Д, наблюдается снижение активности в проростках ряда изоферментов.

Катодные пероксидазы оказались более чувствительными к действию актиномицина Д и хлорамфеникола. При этом, после 43 ч роста под действием ингибиторов задерживается появление активности в общем тех же пероксидаз, что и в случае применения ИУК и 2,4-Д (рис. 4Г 2—3). Дальнейшее прорастание в присутствии ингибиторов приводит к появлению в 92-часовых проростках ряда зон (рис. 4Д 3), отсутствовавших в 43-часовых проростках, и одновременно препятствует снижению активности наиболее быстродвижущихся и некоторых других малоинтенсивных зон пероксидазы, которое к этому времени наблюдается у контроля (рис. 4Д 1). Таким образом, в данных опытах хлорамфеникол и актиномицин Д отодвигают появление или исчезновение изоферментов пероксидазы во времени.

В последующем приведены результаты, полученные при одновременном действии актиномицина Д и 2,4-Д (рис. 4В 5). Для сравнения приведена электрофореграмма проростков, обработанных 42 ч только 2,4-Д (рис. 4В 4). Присутствие в среде сначала актиномицина Д, а затем 2,4-Д и антибиотика приводит к общему снижению интенсивности ряда зон пероксидазы. Несмотря на наличие в смеси актиномицина Д, подавлена одна из двойных зон в самой верхней части геля, как это часто обнаруживается при одном 2,4-Д. С другой стороны, при наличии в среде только 2,4-Д без актиномицина Д в проростках активировались характерные высокоактивные триплеты изоферментов, расположенные в средней части энзимограммы (рис. 4В 4), появление которых в данном опыте в присутствии актиномицина было значительно подавлено (рис. 4В 5), хотя и наблюдалось известное перераспределение активности между малоинтенсивными зонами в средней части геля.

При рассмотрении изоферментов, разделенных в катионной системе электрофореза (рис. 4Ж), обнаруживается, что актиномицин Д не препятствует подавлению интенсивности зон в верхней и средней частях геля (рис. 4Ж 5), как это происходит и в присутствии одного 2,4-Д (рис. 4Ж 4). Обработка актиномицином Д приводит, однако, к значи-



тельному ингибированию одного из двух нижних изоферментов, индуцируемых обычно 2,4-Д. Таким образом, один актиномицин Д задерживает появление или исчезновение в ходе роста ряда изоферментов, движущихся к катоду. В смеси с 2,4-Д антибиотик значительно подавляет появление одного из двух изоферментов, индуцируемых одной 2,4-Д, и не препятствует подавлению ряда других изоферментов.

### Обсуждение

Наши опыты еще раз подтвердили значительную изменчивость состава изоферментов пероксидазы при прорастании, отмеченную рядом авторов (Маско и др., 1967; Bhatia, Nilson, 1969; Alexandrescu, Hagima-Călin, 1970). При прорастании на энзимограмме пероксидазы наблюдается появление ряда новых изоферментов и исчезновение или ослабление некоторых других, представленных в зародыше непроросшего семени.

Активность изоферментов, движущихся к аноду, в непроросшем семени и в первые 18 ч прорастания относительно низка. За последующие сутки общая пероксидазная активность значительно возрастает, что сопровождается исчезновением двух ранее доминирующих изоферментов и образованием ряда новых. Затем, после 42 ч прорастания и до конца опыта состав изоферментов остается сравнительно стабильным.

Катодные пероксидазы в непроросшем и в проросшем в течение 18 ч зародыше сравнительно малоизменчивы по составу и выявляются в виде достаточно интенсивного триплета изоферментов. В ходе последующего роста наблюдается образование ряда новых изоферментов и уменьшение относительной активности триплета пероксидаз, характерного для зародыша и молодых малодифференцированных тканей.

Таким образом, основные сдвиги в составе анодных и катодных пероксидаз и образование новых изоферментов наступают преимущественно после 18 ч прорастания. По данным литературы известно, что замачивание семени сопровождается практически немедленным началом биосинтеза белков в зародыше (Marcus, Feeley, 1964; Allende, Bravo, 1966; Abdul-Baki, 1969). Относительная стабильность состава изоферментов пероксидазы в течение первых 18 ч объясняется, по-видимому, направленностью биосинтеза белка в первую очередь на образование других более нужных для прорастающего зародыша ферментов. Кроме того, вероятно, происходит интенсификация биосинтеза некоторых уже имеющих пероксидаз.

Присутствие различных ростовых веществ при проращивании семян пшеницы приводит к значительным изменениям в изоферментном составе пероксидазы проростков. Известно, что эффект действия фитогормонов в значительной мере зависит от физиологического состояния растения и условий окружающей среды. В настоящем исследовании влияние ростовых веществ изучалось на фоне эндогенных ингибиторов и стимуляторов роста цельных проростков, выращиваемых на водной среде в контакте с эндоспермом, поэтому результаты эти не вполне сравнимы с работами, где фитогормонами обрабатываются изолированные ткани или отрезки органов, однако некоторые параллели можно все же провести.

Многими авторами (Key, Shannon, 1964; Nooden, Thimann, 1965; Masuda, 1969; Masuda, Kamisaka, 1969 и др.), работающими с изолированными органами или кусочками тканей, установлено, что для стимулирующего действия ауксинов на рост необходим биосинтез белка



и нуклеиновых кислот. В соответствии с этим в настоящее время выдвинута гипотеза о первичной направленности действия ростовых веществ на нуклеиновый обмен клетки. Тут же следует, однако, отметить, что ряд исследователей (Полевой, 1965; Гамбург, 1970 и др.) считает индуцирование синтеза РНК и белка одной из возможных сторон, однако отнюдь не всегда первопричиной действия фитогормонов.

В наших опытах действие ростовых веществ в течение первых 18 ч не выявлялось и стало обнаруживаться тогда, когда взамен или в дополнение к имеющимся в зародышах изоферментам пероксидазы начали появляться новые. Установлено (Marcus, Feeley, 1964; Chen и др., 1968а, б), что биосинтез белка в зародыше пшеницы в первые 12—24 ч прорастания происходит на матрицах «долгоживущей» и-РНК, имеющейся в замаскированном виде уже в зародыше сухого зрелого семени. Таким образом, можно заключить, что первая стадия действия ростовых веществ в наших опытах проходила в условиях функционирования именно этой и-РНК. Как было показано, присутствие в среде ростовых веществ в это время на трансляции «долгоживущей» и-РНК при биосинтезе белка пероксидазы качественно не сказывалось.

На более поздних этапах прорастания начинается транскрипция собственно геномной ДНК зародыша с образованием новой и-РНК. Так, в частности, показано (Chen и др., 1968а, б), что к 48 ч прорастания синтез белков в зародыше пшеницы осуществляется уже отчасти на матрицах новосинтезированной и-РНК, хотя продолжает функционировать еще и «старая долгоживущая» и-РНК непроросшего зародыша.

Результаты наших опытов с ингибитором биосинтеза РНК актиномицином Д, который подавлял появление ряда катодных новых изоферментов при прорастании, возможно, указывают на необходимость образования новой и-РНК в качестве матрицы для индуцирования синтеза новых изоферментов пероксидазы. Это предположение, однако, не является убедительным, поскольку актиномицин Д подавляет также синтез рибосомальной РНК и рибосом, что приводит в конечном счете и к подавлению биосинтеза белка. Этим можно объяснить и более медленное образование новых изоферментов пероксидазы в присутствии актиномицина Д. Не исключено, что в условиях наших опытов *in vivo* действие актиномицина Д на биосинтез изоферментов пероксидазы обусловлено не его непосредственным вмешательством в синтез и-РНК и пероксидазы, а является косвенным результатом его подавляющего действия на образование рибосом и общий уровень биосинтеза белка. Следует также учесть возможность урегулирования фитогормонами процессов трансляции различных локусов «долгоживущей» и-РНК.

Появление новых пероксидаз в течение роста зародыша может быть вызвано также переходом неактивной формы фермента в активную. Недавними опытами (Austine и др., 1970) с использованием метки дейтерием было, однако, доказано, что новые изоферменты пероксидазы, выявляющиеся при прорастании семян ячменя, образуются не из неактивных предшественников, а в результате биосинтеза ферментного белка *de novo*. Одновременно показано, что биосинтез тех изоферментов пероксидазы непроросшего зародыша, которые исчезают при прорастании, не происходит. На основе вышесказанного можно, по-видимому, заключить, что обнаружение эффекта ростовых веществ в наших опытах на стадии появления новых изоферментов пероксидазы свидетельствует о способности их регулировать процессы биосинтеза новообразующегося белка. На какое звено нуклеинового обмена при этом направлено действие ростовых веществ, остается открытым.



В наших опытах все изучаемые ростовые вещества (ИУК, НУК и 2,4-Д), кроме кинетина, в зависимости от концентрации в большей или меньшей мере задерживали появление в проростках в ходе роста новых изоферментов пероксидазы. Большинство из этих недостающих изоферментов пероксидазы выявлялось, несмотря на присутствие ауксина, после более продолжительного роста проростков. Кроме подавления образования новых изоферментов, ростовые вещества предотвращали исчезновение на более поздних этапах прорастания некоторых пероксидаз, свойственных для молодых малодифференцированных тканей. Таким образом, все применяемые нами ростовые вещества, за исключением кинетина, обладали одинаковым эффектом — отодвигали во времени назревающие в ходе нормального роста изменения в спектре пероксидаз, сохраняя состав изоферментов, характерный для более молодых тканей.

Сходные с нашими результаты о тормозящем действии фитогормонов на новые изоферменты пероксидазы, образующиеся в ходе развития или старения, получили и некоторые другие авторы, работающие с отрезками различных тканей или органов (Osborn, Hallaway, 1960; Ockerse и др., 1966; Lavee, Galston, 1967; Sacher, 1967; Whitmore, 1971). Показано (Sarkissian, Spelsberg, 1967), что обработка ИУК приближает состав белков дифференцированных тканей к составу малодифференцированных меристематических тканей, индуцируя, таким образом, молекулярную дедифференциацию. Все эти данные позволяют предполагать существенную роль и эндогенных фитогормонов в процессах развития и старения тканей.

Кроме сходного с использованными ауксинами действия, 2,4-Д в наших опытах вызвала значительное каллусообразование, сопровождающееся усилением или даже индуцированием биосинтеза некоторых изоферментов пероксидазы. Так, под действием 2,4-Д отмечалось активирование образования двух новых катодных изоферментов, практически отсутствовавших в проростках, выращенных без 2,4-Д или в присутствии ИУК. Наблюдалось также усиление биосинтеза некоторых анодных пероксидаз. Следовательно, 2,4-Д обладает способностью селективно подавлять образование одних и активировать синтез других изоферментов пероксидазы. О селективной индукции и репрессии образования изоферментов пероксидазы в изолированных колеоптилях овса под действием ИУК и 2,4-Д сообщали недавно и другие авторы (Stuber, Levings, 1969). В наших условиях способностью индуцировать образование новых изоферментов обладала лишь 2,4-Д.

Регуляция биосинтеза белка метаболитами, в том числе и ауксинами, может осуществляться теоретически как на уровне транскрипции ДНК с образованием специфической и-РНК, так и на уровне трансляции и-РНК. Кроме того, сдвиги биосинтеза белка метаболитами могут являться результатом косвенного, многоступенчатого воздействия на этот процесс.

В наших опытах отмечалось частичное устранение активирующего действия 2,4-Д на образование двух анодных и одного из двух новых катодных изоферментов ингибитором биосинтеза РНК — актиномицином Д. Можно предположить, что синтез изоферментов пероксидазы на первых этапах прорастания и в присутствии актиномицина Д происходит на матрицах «долгоживущей» и-РНК зародыша. Как известно, актиномицин Д подавляет транскрипцию новой и-РНК, но не влияет на трансляцию имеющейся «долгоживущей» и-РНК. Из этого следует, что 2,4-Д регулирует биосинтез рассматриваемых изоферментов пероксидазы путем воздействия на уровне транскрипции новой и-РНК и не



активирует трансляцию соответствующих этим изоферментам локусов «долгоживущей» и-РНК. Однако, поскольку актиномицин Д не предотвращал появления второго из новых катодных изоферментов, специфических для 2,4-Д, то последняя, видимо, может активировать и трансляцию некоторых локусов «долгоживущей» и-РНК.

Таким образом, результаты наших опытов с актиномицином Д указывают на возможность воздействия 2,4-Д как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Полученные с применением актиномицина Д данные, однако, нельзя еще считать окончательно убедительными для решения этого вопроса. Следует сказать, что относительно биохимического механизма, регулирующего действие ростовых веществ на процессы биосинтеза и развития, вообще пока нет единогласия. В литературе встречаются высказывания в пользу регулирования фитогормонами процессов использования образующейся или уже имеющейся в зародыше и-РНК в качестве матрицы для синтеза белка (Chen, Osborne, 1970; Gayler, Glaszew, 1969 и др.). Другие авторы (Key, Shannon, 1964; Sacher, 1967 и др.) считают, что механизм действия ауксинов и цитокининов связан в первую очередь с регуляцией синтеза РНК.

### Выводы

Присутствие ростовых веществ при проращивании семян пшеницы в течение первых 18 ч на изоферментном составе пероксидазы зародыша не сказывалось. Действие их стало обнаруживаться тогда, когда взамен или в дополнение к имеющимся в 18-часовых зародышах основным изоферментам пероксидазы начали появляться новые. Все ростовые вещества, за исключением кинетина, в зависимости от концентрации в большей или меньшей мере задерживали во времени появление в проростках новых изоферментов пероксидазы. На более поздних этапах проращивания эти же вещества предотвращали исчезновение некоторых пероксидаз, свойственных для малодифференцированных тканей. 2,4-Д вызвала каллусообразование, сопровождающееся характерным активированием биосинтеза некоторых изоферментов пероксидазы. Актиномицин Д частично устранял активирующее действие 2,4-Д на образование двух анодных и одного из двух новых катодных изоферментов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Гамбург К. З., 1970. Фитогормоны и клетки. М.: 38—51.
- Полевой В. В., 1965. Влияние ауксина на нуклеиновый и белковый обмен растительных тканей. В кн.: Регуляторы роста растений и нуклеиновый обмен. М.: 27—47.
- Abdul-Baki A. A., 1969. Metabolism of barley seed during early hours of germination. *Plant Physiol.* **44** (11) : 733—738.
- Alexandrescu V., Hagima-Călin I., 1970. Peroxidaza din grin in primele etape de crestere. *St. cerc. biochim.* **13** (2) : 113—120.
- Allende J. E., Bravo M., 1966. Amino acid incorporation and aminoacyl transfer in a wheat embryo system. *J. Biol. Chem.* **241** (24) : 5813—5818.
- Austine W., Jacobsen J. V., Scandalios J. G., Varner J. E., 1970. Deuterium oxide as a density label of peroxidases in germinating barley embryos. *Plant Physiol.* **45** (2) : 148—152.
- Bastin M., 1964. The active enzymatic center of indoleacetic acid peroxidation. *Bull. Soc. roy. sci. Liège* **33** (11) : 678—683.
- Bhatia C. R., Nilson J. P., 1969. Isoenzyme changes accompanying germination of wheat seeds. *Biochem. Genetics* **3** : 207—214.
- Chen D., Osborne D. J., 1970. Hormones in the translational control of early germination of wheat embryos. *Nature (Engl.)* **226** (5251) : 1157—1160.
- Chen D., Sarid S., Katchalski E., 1968a. Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **60** (3) : 902—909.



- Chen D., Sarid S., Katchalski E., 19686. Protein biosynthesis in germinating wheat embryos. *Agrochimica* **12** (5) : 389—397.
- Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121** (2) : 404—427.
- Evans J., Alldridge N. A., 1965. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Phytochemistry* **4** (3) : 499—503.
- Galston A. W., Bonner J., Baker R. S., 1953. Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system of peas. *Arch. Biochem. Biophys.* **42** (2) : 456—470.
- Gayler K. R., Glasziou K. T., 1969. Plant enzyme synthesis hormonal regulation of invertase and peroxidase synthesis in sugar cane. *Planta (Berl.)* **84** (2) : 185—194.
- Jaaska Vilve, Jaaska Vello, 1969. Heterogeneity and tissue specificity of some enzymes in kidney bean. *Eesti NSV TA Toimet. Biol.* **18** (4) : 408—416.
- Kamerbeek G. A., 1956. Peroxydase content of dwarf types and giant types of plants. *Acta bot. neerl.* **5** (3) : 257—263.
- Key J. L., Shannon J. C., 1964. Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised soybean hypocotyl tissue. *Plant Physiol.* **39** (3) : 360—364.
- Lavee S., Galston A. W., 1967. Hormonal control of peroxidase isoenzymes in tobacco pith tissue. *Plant Physiol.* **42** (Suppl.) : 5—16.
- Macko V., Honold G. R., Stahmann M. A., 1967. Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. *Phytochemistry* **6** (4) : 465—471.
- McCune D. C., Galston A. W., 1959. Inverse effects of gibberellin on peroxidase activity and growth on dwarf strains of peas and corn. *Plant Physiol.* **34** (4) : 416—418.
- Marcus A., Feeley J., 1964. Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **51** (6) : 1075—1079.
- Masuda Y., 1969. Auxin-induced cell expansion in relation to cell wall extensibility. *Plant and Cell Physiol.* **10** (1) : 1—9.
- Masuda Y., Kamisaka S., 1969. Rapid stimulation of RNA biosynthesis by auxin. *Plant and Cell Physiol.* **10** (1) : 79—86.
- Nooden L. D., Thimann K. V., 1963. Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **50** (2) : 194—200.
- Nooden L. D., Thimann K. V., 1965. Inhibition of protein synthesis and of auxin-induced growth by chloramphenicol. *Plant Physiol.* **40** (1) : 193—201.
- Ockerse R., Siegel B. Z., Galston A. W., 1966. Hormone induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. *Science* **151** (3709) : 452—453.
- Osborn D. J., Hallaway M., 1960. Auxin control of protein-levels in detached autumn leaves. *Nature* **188** (4746) : 240—241.
- Penny P., Galston A. W., 1966. The kinetics of inhibition of auxin-induced growth in green pea stem segments by actinomycin D and other substances. *Amer. J. Bot.* **53** (1) : 1—7.
- Sacher J. A., 1967. Control of synthesis of RNA and protein in subcellular fractions of Rheo discolor leaf sections by auxin and kinetin during senescence. *Exptl Gerontol.* **2** (4) : 261—278.
- Sarkissian I. V., Spelsberg T. C., 1967. Indoleacetic acid and molecular differentiation: evidence for interaction. *Physiol. Plantarum* **20** (4) : 991—998.
- Sequeira L., Mineo L., 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.* **41** (7) : 1200—1208.
- Shin M., Nakamura W., 1962. Indoleacetic acid oxidase activity of wheat peroxidase. *J. Biochem.* **52** (6) : 444—451.
- Stuber C. W., Levings C. S., 1969. Auxin induction and repression of peroxidase isoenzymes in oats (*Avena sativa* L.). *Crop Sci.* **9** (4) : 415—416.
- Whitemore T. W., 1971. Effect of indoleacetic acid and hydroxyproline on isoenzymes of peroxidase in wheat coleoptiles. *Plant Physiol.* **47** (2) : 169—171.
- Yoneda Y., Endo T., 1970. Peroxidase isoenzymes and their indoleacetate oxidase activity in the Japanese Morning Glory, *Pharbitis nil*. *Plant and Cell Physiol.* **11** (3) : 503—506.



VILVE JAASKA

MÕNINGATE KASVUAINETE TOIME PEROKSÜDAASI ISOFERMENTIDELE  
IDANEVAS NISUS

Resüme

Uuriti 3-indolüläädikhape, 1-naftüläädikhape, 2,4-dikloorfenoksüaadikhape (2,4-D) ja kinetiini toimet peroksüdaasi isofermentidele idanevas nisus. Tehti kindlaks, et kasvuainete manulus keskkonnas ei mõjutanud embrüo peroksüdaasest koostist idanemise esimese 18 tunni jooksul. Nende ainete toime ilmes siis, kui lisaks 18 tundi idanenud embrüos leiduvatele peroksüdaasi isofermentidele hakkasid tekkima uued. Kontsentratsioonist olenevalt põhjustasid kõik kasvuained peale kinetiini kontrolliga võrreldes suuremal või vähemal määral uute isofermentide moodustumise aeglustumise. Hilisematel kasvu-etappidel pidurdasid samad ained mõningate vähediferentseeritud kudede iseloomulike isofermentide aktiivsuse vähenemist kasvu kestel. 2,4-D kutsus esile intensiivse kalluskoe tekke, millele kaasnes mõningate isofermentide moodustumise spetsiifiline aktiveerimine. Aktinomütsiin D pidurdas osaliselt 2,4-D aktiveerivat toimet kahe anoodse ja ühe uue katoodse peroksüdaasi isofermenti tekkimisele, ei mõjutanud aga teise spetsiifilise katoodse isofermenti moodustumist 2,4-D toimel.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saanud  
24. IX 1971

VILVE JAASKA

EFFECT OF SOME GROWTH SUBSTANCES ON PEROXIDASE  
ISOENZYMES IN WHEAT GERMINATION

Summary

The effect of 3-indolylacetic acid, 1-naphthylacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on peroxidase isoenzyme pattern in germinating wheat seedlings was studied. No detectable changes were observed in the peroxidase pattern of embryo during the first 18 h of germination and auxin treatment. Thereafter, all the growth substances studied, except kinetin, suppressed and delayed the appearance of new peroxidase isoenzymes observed during the germination. At later stages of seedling growth, the auxins put off the disappearance of some isoenzymes characteristic of embryo tissues. 2,4-D induced extensive callus formation accompanied by selective formation of certain isoenzymes. Actinomycin D partially eliminated the activating effect of 2,4-D on one cathodal and two anodal peroxidases, but failed to suppress the development of another cathodal isoenzyme induced by 2,4-D.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
Sept. 24, 1971