

ВИЛЬВЕ ЯАСКА, ВЕЛЛО ЯАСКА

ИЗОФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ КАРТОФЕЛЯ

Дифференцировка тканей и онтогенетическое развитие выражаются, прежде всего, в значительном количественном и качественном изменении ферментных, структурных и регуляторных белков. Согласно современным представлениям, синтез каждого из белков контролируется генетической информацией, заключенной в ДНК ядра и других плазматических структур клетки. Поэтому изучение упорядоченного в пространстве и времени синтеза и распада белков — один из основных путей раскрытия генетических и молекулярных механизмов дифференцировки и развития.

Одним из доступных подходов к выявлению закономерностей регуляции биосинтеза специфических белков является электрофоретическое исследование сдвигов качественного состава ферментов в отдельных органах и тканях на различных этапах онтогенетического развития. Настоящее сообщение посвящено результатам изучения тканевой специфичности и изменчивости систем некоторых изоферментов (фосфатазы, эстеразы, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и пероксидазы) в покоящихся, прорастающих и «стареющих» (в смысле длительной инкубации в аэрируемой воде) тканях картофеля.

Материал и методика

Материалом опыта служили клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., 'Йыгева коллане'). Белковые экстракты получены растиранием 1 г промытых дистиллированной водой и очищенных срезов с холодной буферной смесью в двукратном объеме, состоящей из 0,25 М сахарозы, 0,1 М трис-гидроксиаминометана, 0,06 М аскорбиновой кислоты и 0,005 М ЭДТА (рН 7,6—7,8). Полученный гомогенат центрифугировался в рефрижераторной центрифуге при 18 000 г 30 мин. Надосадочная жидкость сливалась, к ней добавлялся инертный носитель сефадекс G-200 (5—10 мг/1 мл) и хранилась в замороженном виде при -10°C .

Клубни проращивались в земле при дневном свете около месяца. Ростки обламывались через 1—1,5 недели роста. Гомогенаты из листьев, стеблей, корней и ростков готовились с помощью буфера в четырехкратном объеме вышеописанным способом.

Для «старения» 2—3 мм срезы клубня инкубировались в течение 3 дней в аэрируемой стерильным воздухом дистиллированной воде при 20—23° в темноте. Воду меняли ежедневно.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводился по Б. Дж. Дэвису (Davis, 1964) с некоторыми изменениями, описанными нами ранее (Jaaska, Jaaska, 1969); выявление фосфогидролазной, эстеразной и пероксидазной активности описано там же.

Для гистохимического обнаружения дегидрогеназ гели инкубировались в среде, состоящей из 5,0 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6), 1 мл 0,2 М субстрата, 0,5 мл 0,5% НАД или НАДФ (в случае глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), 1,0 мл 0,2%-ного гидрохлорида нитросинего тетразолия, изготовленного в 5%-ном диметилформамиде, и 0,5 мл 0,05%-ного фенозинметосульфата. Инкубирование проводилось в темноте при 35—40° в течение 1—2 ч.

Результаты

На рис. 1 приведены энзимограммы растворимых кислых фосфатаз (А), эстераз (Б) и глутаматдегидрогеназ (В) различных тканей картофеля. Относительная электрофоретическая подвижность отдельных фракций изоферментов от места нанесения пробы приведена в условных единицах. Как видно из рис. 1, носителем фосфатазной активности по отношению к нафтилфосфату в клубне и вегетативных органах картофеля (энзимограммы *a—г*) является одна фракция. При прорастании в ходе дальнейшей дифференцировки тканей качественный состав этого фермента не подвергался значительной перестройке. Появление, наряду с основной фракцией, новых, менее активных зон фосфатазной активности наблюдалось лишь у листьев после длительной инкубации гелей (энзимограмма *в'*).

У эстераз (рис. 1Б) в ходе прорастания обнаружены значительные качественные сдвиги в изоферментном составе. В покоящихся тканях картофеля (*a*) эстеразная активность по отношению к нафтилацетату выявлена в виде двух высокоактивных изоферментов с подвижностью около 5,1 и 5,7. Третья фракция с подвижностью около 2 появляется только после длительной инкубации (*a'*), когда две более подвижные фракции уже слились в расплывчатое пятно. При выходе клубня из состояния покоя (*e*) фракция с подвижностью около 2 обнаруживается еще до слияния двух основных изоферментов, что свидетельствует о сдвиге в относительной активности фракций. В проростках (*б*) эстеразная активность менее подвижной фракции (или фракций) приобретает значительный перевес над активностью более подвижных фракций, которые выявляются при увеличении времени инкубации. Листья (*в*), стебли (*г*) и корни имеют нечеткую картину изоферментов, общей чертой которой является целый набор фракций с подвижностью около 2.

НАД-зависимая L-глутаматдегидрогеназа (рис. 1В) тканей покоящегося клубня (*a*) и всех новообразовавшихся органов (*в, г, д*) выявляется на энзимограмме в виде одной четкой зоны.

Малатдегидрогеназная активность в клубне (рис. 2А *a*) наблюдается в виде не менее двух фракций изоферментов с подвижностью около 3,6 и 4,3. В ходе прорастания (*e*) активность верхней, менее подвижной фракции в клубне подавляется полностью или почти полностью. В листьях (*в*) количество фракций с малатдегидрогеназной активностью значительно возрастает, что, по-видимому, связано с новыми функциями фермента в этих органах. В стеблях (*г*) и корнях (*д*) малатдегидрогеназная активность выявляется в виде слабых размычатых фракций, точное число которых определить трудно.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, как известно, первостепенное значение имеет в обеспечении таких важнейших путей обмена, как реакции пентозо-монофосфатного шунта и фотосинтеза. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (рис. 2Б) тканей клубня (*a*) дает на гелях одну широкую зону с подвижностью около 3,6, которая, возможно, складывается из ряда подфракций. Вторая зона с подвижностью 2,3 обнаруживается только после длительного инкубирования (*a'*). В ростке (*б*) происходит, по-видимому,

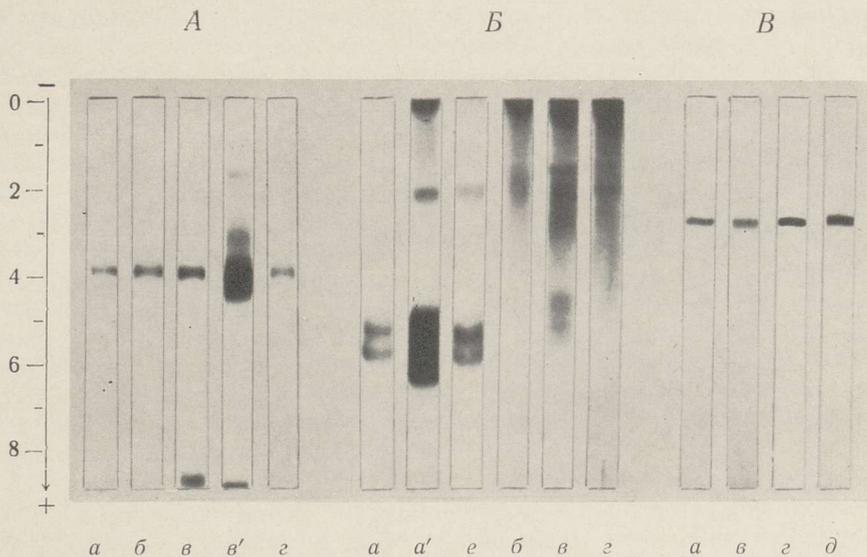


Рис. 1. Энзимогаммы растворимой кислой фосфатазы (А), эстеразы (В) и глутаматдегидрогеназы (В) различных тканей картофеля. Обозначения энзимогамм: *a* — покоящийся клубень, *a'* — клубень после длительной инкубации, *b* — росток, *v* — лист, *v'* — лист после длительной инкубации, *g* — стебель, *d* — корень, *e* — прорастающий клубень, *c* — «стареющий» клубень (начало инкубации).

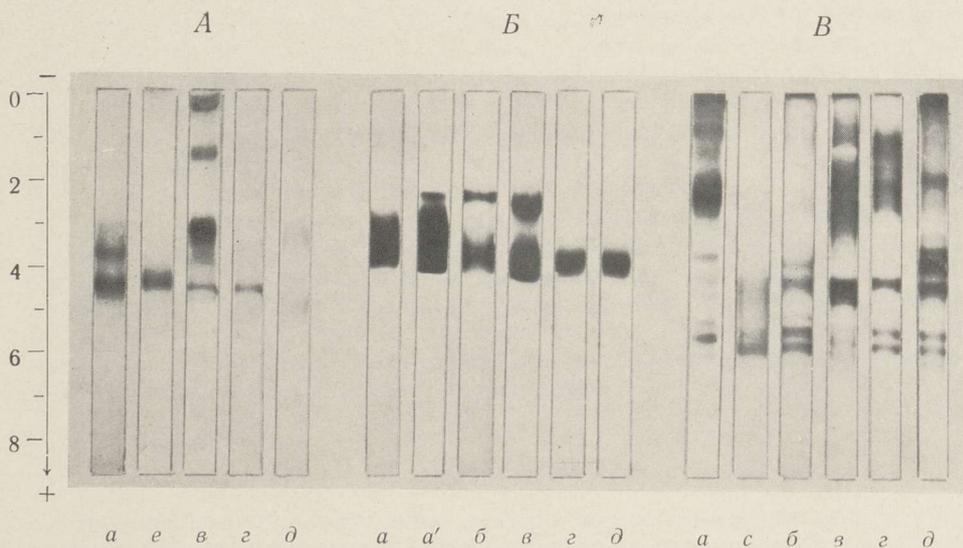


Рис. 2. Энзимогаммы растворимой малатдегидрогеназы (А), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (В) и пероксидазы (В) различных тканей картофеля. Обозначения см. рис. 1.

изменение соотношения активностей изоферментов и верхняя, менее подвижная фракция выявляется наряду с нижней. В надосадочной жидкости, полученной из листьев (*в*), активны обе фракции. Стебли и корни (*г*, *д*) характеризуются одной фракцией глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Пероксидазы клубня (рис. 2*В*, *а*) в процессе онтогенеза подвергались значительным изменениям. Пероксидазная активность в покоящемся клубне выявляется в виде 9—10 фракций, притом одна, наиболее интенсивная зона с подвижностью около 2,2 включает ряд подфракций. На электрофореграммах отростка (*б*) обнаруживаются (по сравнению с клубнем) значительные качественные сдвиги — несколько изменяется состав фракций с подвижностью выше 3,8 и значительно подавляется активность изоферментов, имеющих подвижность менее 2,7. Последние обнаруживаются при несколько большем времени инкубации. Активность фракций этой же зоны в гомогенатах корней (*д*), и в особенности листьев (*в*) и стеблей (*г*), вновь повышается. На фореграммах корней, кроме того, появляется несколько добавочных фракций с подвижностью между 3,1—3,9, свойственных только корням.

На рис. 2*В*, *с* представлена электрофореграмма пероксидазы тканей клубня после 3-дневного инкубирования в дистиллированной воде. Параллельно «старению» в дистиллированной воде инкубация дисков проводилась в присутствии хлорамфеникола (50 $\mu\text{г}/\text{мл}$) с целью предотвращения бактериального заражения. По имеющимся указаниям (Leaver, Edelman, 1965), такая концентрация хлорамфеникола подавляет бактериальный рост до незначительного, не влияя при этом на метаболическую активность запасующих тканей.

В изоферментном составе фосфатазы, эстеразы, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при «старении» каких-либо качественных отклонений по сравнению с покоящимся клубнем отмечено не было. Однако на электрофореграмме пероксидазы наблюдаются значительные изменения относительной активности отдельных изоферментов, что дает электрофореграмму, четко отличающуюся от таковой покоящейся ткани. Так, в отличие от покоящегося клубня на фореграмме «стареющих» тканей первыми выявляются и наиболее интенсивными оказываются фракции, движущиеся к аноду с наибольшей скоростью и имеющие электрофоретическую подвижность 4,1 и более. Наряду с этим, количество высокоактивных пероксидазных фракций в верхней части геля уменьшается, хотя некоторые из них и выявляются после увеличения времени инкубации. Гомогенаты дисков, инкубированных в присутствии хлорамфеникола, дали аналогичную картину изоферментов пероксидазы. Таким образом, наблюдаемые в энзимограмме пероксидазы изменения не вызваны бактериальным загрязнением, а индуцированы инкубированием срезов в аэробных условиях.

Обсуждение

Как показывают полученные результаты, отдельные ферменты существенно различаются между собой по степени изменчивости в ходе прорастания и дифференциации тканей картофеля. Наиболее стабильной среди изученных ферментов оказалась глутаматдегидрогеназа, которая во всех тканях выявлялась в виде одной фракции с постоянной электрофоретической подвижностью. Кислая фосфатаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа по качественному составу сравнительно устойчивы и в процессе дифференциации изменяются мало. Несколько более значительные сдвиги отмечались в составе малатдегидрогеназы. Особенно существен-

ные изменения, однако, наблюдались в изоферментном составе пероксидазы и эстеразы.

Среди изученных тканей наиболее характерные особенности в изоферментном составе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы наблюдались у листьев. Относительные изменения активности отдельных изоферментов или появление новых в листьях, возможно, связаны с их участием в процессах фотосинтеза. Следует, однако, иметь в виду, что нами изучались лишь растворимые ферменты и поэтому характерные сдвиги, происходящие в составе ферментов, прочно связанных со структурой хлоропластов и других органелл, в наших опытах не были обнаружены.

По степени участия в процессах жизнедеятельности ферменты можно условно разделить на две группы: универсалы, управляющие основными процессами обмена веществ, и специальные, обеспечивающие определенные функции организма или ткани (Медведев, 1968). Изученные нами ферменты, катализирующие реакции, происходящие во всех типах растущей ткани вне зависимости от уровня дифференциации, можно отнести к группе универсальных. Для этой группы ферментов в ходе дифференциации и развития отмечается регулирование в основном по типу усиления или ослабления активности отдельных изоферментов.

Полученные данные указывают также на то, что даже у ферментных систем общего типа могут появляться отдельные изоферменты, выполняющие, по-видимому, более узкоспецифические функции. Об этом свидетельствует, например, появление новых фракций малатдегидрогеназы у листьев и пероксидазы у корней, которые отсутствуют в других типах тканей. К настоящему времени накопилось уже много данных о наличии у растений, наряду с общими для всех тканей ферментами, изоферментов, характерных только для отдельных органов или появляющихся лишь в определенных ограниченные периоды развития (см. Jaaska, Jaaska, 1969; Scandalios, 1969 и др.). Это, по-видимому, свидетельствует о дифференцированной активности генов, контролирующих биосинтез определенных изоферментов, в отдельных тканях. Поэтому изучение закономерностей образования орган-специфических изоферментов и динамики изменения изоферментного состава в ходе онтогенеза может содействовать установлению генетико-биохимических основ клеточной дифференциации и морфогенеза.

Наряду с выявлением изменений в ферментных системах, происходящих в ходе нормального развития, представляет также интерес возможность их искусственного индуцирования под действием внешних факторов. В этом отношении ткань покоящегося клубня картофеля является одним из наиболее удобных и часто применяемых объектов. Известно (Steward, Preston, 1940), что нарушение состояния покоя путем инкубирования тонких срезов клубня в аэробных условиях сопровождается значительной активацией обмена веществ и, в первую очередь, повышением интенсивности дыхания. Характерно, что индуцированное аэробными условиями дыхание качественно отличается от дыхания покоящейся ткани.

Тщательные биохимические исследования показали (Laties, 1964; Romberger, Norton, 1961 и др.), что в покоящейся ткани клубня в значительной мере подавлен цикл трикарбоновых кислот, который активируется при «старении» срезов в аэробных условиях. Показано, что «старение» сопровождается синтезом новых РНК и белка, а ингибиторы белкового синтеза предотвращают увеличение интенсивности дыхания (Calo и др., 1957; Click, Hackett, 1963 и др.). Это привело к предположению, что активированное дыхание при «старении» находится в прямой зависимости от степени синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Наши опыты показали, что «старение» срезов в аэробных условиях индуцировало образование новых фракций таких ферментов дыхания, как малатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа, которые присутствовали в высокоактивном виде уже в экстрактах ткани покоящегося клубня. Другими исследователями (Hackett и др., 1960 и др.) показано, что митохондрии, выделенные как из покоящихся, так и из «стареющих» срезов клубня картофеля, в одинаковой степени способны окислять кислоты трикарбонового цикла и осуществлять сопряженное с окислением фосфорилирование. Это привело к представлению о наличии в покоящихся тканях какого-то ингибитора цикла трикарбоновых кислот, распадом или вымыванием которого объясняется активирование дыхания при «старении» срезов (Laties, 1964). Эндогенные ингибиторы действительно были обнаружены в покоящихся клубнях картофеля (см. Hemberg, 1967). Недавно (Edelman, Bradshaw, 1969) в клубнях артишока обнаружен ингибитор белкового синтеза, который вымывался из ткани при ее «старении» в аэрируемой воде.

Наличием в покоящемся клубне эндогенных ингибиторов, однако, нельзя объяснить зависимость активирования дыхания при «старении» от необходимости предварительного синтеза РНК и белка. По-видимому, для активирования дыхания при «старении» срезов, кроме удаления эндогенных ингибиторов, требуется еще и биосинтез некоторых недостающих в покоящейся ткани белковых компонентов. Среди изученных нами ферментов качественные изменения были обнаружены лишь в изоферментах пероксидазы. Наблюдаемые сдвиги в составе пероксидазы и подавление активности некоторых изоферментов, однако, объяснить трудно, так как пока еще не ясно, какие специфические функции она выполняет в растительных тканях. Ранее в «стареющих» срезах было выявлено образование новых ферментов — инвертазы (Edelman, Hall, 1965), фенилаланин-аммиаклиазы (Zucker, 1965), отсутствующих в покоящейся ткани. Все эти данные показывают, что, кроме сдвигов в относительной активности некоторых ферментов при «старении» в аэробных условиях, происходят и качественные изменения в белковом синтезе.

Выводы

В ходе онтогенетического развития картофеля качественно наиболее стабильной оказалась глутаматдегидрогеназа; кислая фосфатаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа изменялись мало. Более существенные сдвиги в изоферментном составе наблюдались у эстеразы и пероксидазы. Электрофореграммы фосфатазы, эстеразы, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы «стареющих» в аэробных условиях и покоящихся тканей качественно сходны. Значительные качественные изменения, по сравнению с покоящимся клубнем, наблюдались в изоферментах пероксидазы.

ЛИТЕРАТУРА

- Медведев Ж. А., 1968. Молекулярно-генетические механизмы развития. М. : 151.
Calo N., Marks J. D., Varner J. E., 1957. Respiratory metabolism of aerated potato disks. *Nature* **180** (4595) : 1142.
Click R. E., Hackett D. P., 1963. The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **50** (2) : 243—250.
Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121** (2) : 404—427.

- Edelman J., Bradshaw M. J., 1969. Enzyme synthesis in higher plant tissue. A protein inhibitor of invertase synthesis secreted by tissue slices of *Jerusalem artichoke*. *Planta* **84** (1) : 94—96.
- Edelman J., Hall M. A., 1965. Enzyme formation in higher plant tissues. Development of invertase and ascorbate-oxidase activities in mature storage tissue of *Heliantus tuberosus* L. *Biochem. J.* **95** (2) : 403—410.
- Hackett D. P., Haas D. W., Griffiths S. K., Niederpruem D. J., 1960. Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **35** (1) : 8—19.
- Hemberg T., 1967. The action of endogenous growth-inhibiting substances and gibberellins on the rest-period of the potato tuber. *Wiss. Z. Univ. Rostock* **16** (4/5) : 661—666.
- Jaaska Vilve, Jaaska Vello, 1969. Heterogeneity and tissue specificity of some enzymes in kidney bean. *Eesti NSV TA Toimet., Biol.* **18** (4) : 408—416.
- Laties G. G., 1964. The relation of glycolic acid absorption to respiration in potato tissues. *Plant Physiol.* **39** (3) : 391—397.
- Leaver C. J., Edelman J., 1965. Antibiotics as a means of control of bacterial contamination of storage tissue disks. *Nature* **207** (5000) : 1000—1001.
- Romberger J. A., Norton G., 1961. Changing respiratory pathways in potato tuber slices. *Plant Physiol.* **36** (1) : 20—29.
- Scandalios J. G., 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* **3** (1) : 37—80.
- Steward F. C., Preston C., 1940. Metabolic processes of potato disks under conditions conducive to salt accumulation. *Plant Physiol.* **15** (1) : 23—61.
- Zucker M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant. Physiol.* **40** (5) : 779—784.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
19/III 1970

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

ISOFERMENTSED SÜSTEEMID KARTULI VEGETATIIVSETES ORGANITES

Resüme

Uuriti happelise fosfataasi, esteraasi, glutamaatdehüdrogenaasi, malaatdehüdrogenaasi, glükooso-6-fosfaatdehüdrogenaasi ja peroksüdaasi isoensüümide koospetsiifilisust ja muutlikkust kartuli puhkeseisundis olevates, kasvavates ja aeroobsetes tingimustes inkubeeritavates («vananevates») kudedes.

Ontogeneetilise arenemise vältel osutus glutamaatdehüdrogenaas kvalitatiivselt kõige püsivamaks, happeline fosfataas ja glükooso-6-fosfaatdehüdrogenaas muutusid vähe. Kõige suuremaid nihkeid isofermentides puhkeseisundis oleva koega võrreldes täheldati esteraasi ja peroksüdaasi puhul. Happelise fosfataasi, esteraasi, glutamaat-, malaat- ning glükooso-6-fosfaatdehüdrogenaasi elektroforegrammid olid puhkeseisundis olevail ja aeroobsetes tingimustes inkubeeritavail kudedel kvalitatiivselt sarnased, märgatavaid kvalitatiivseid erinevusi täheldati aga peroksüdaasi isoensüümides.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saabunud
19. III 1970

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

ISOENZYME SYSTEMS IN THE VEGETATIVE ORGANS OF POTATO

Summary

Tissue specificity and variability of acid phosphatase, esterase, glutamate dehydrogenase, malatdehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and peroxidase isoenzymes in fresh and aging tuber slices and in growing potato plant have been investigated by means of polyacrylamide gel electrophoresis.

