

<https://doi.org/10.3176/biol.1973.3.05>

УДК 575.1/3+581.14:633.11

ВИЛЬВЕ ЯАСКА, ВЕЛЛО ЯАСКА

РЕГУЛЯЦИЯ МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПРОРАСТАНИИ ТЕТРАПЛОИДНЫХ ПШЕНИЦ

Из многочисленных исследований известно, что у пшениц, как и у всех организмов, ряд ферментов имеет множественные молекулярные формы, которые можно разделить методами гелевого электрофореза и хроматографии. Первоначально предлагалось (Markert, Møller, 1959) назвать все молекулярные формы одного фермента изозимами или изоферментами. Последующие исследования показали (см. обзор: Markert, Whitt, 1968), что множественные молекулярные формы ферментов могут быть обусловлены двумя разными совокупностями причин: генетическими и физико-химическими. Недавно подкомиссия Комиссии по биохимической номенклатуре Международного биохимического союза предложила (IUPAC — IUB Comission..., 1971) термин «изоферменты» сохранить только для тех множественных молекулярных форм, которые обусловлены генетически детерминированными различиями в первичной структуре, и тем самым отказаться от первоначального определения понятия изофермента. Учитывая, что не всегда можно (или целесообразно) довести исследование до выяснения различий первичной структуры молекул фермента, необходимо ввести новый краткий термин для обозначения всех электрофоретически или хроматографически выявляемых множественных молекулярных форм фермента, в качестве которого мы предлагаем «изоформа фермента», например — изоформа фосфатазы, или сокращенно изофосфатаза. Совокупность изоформ составляет мультимолекулярную систему фермента.

Наши предыдущие исследования (Jaaska, 1969, 1971; Jaaska, Jaaska, 1970) показали, что все таксоны тетраплоидных пшениц подразделяются по составу электрофоретически выявляемых изоформ кислой фосфатазы на две группы в полном соответствии с их делением (Мак Кей, 1968 и др.) на два биологических вида или видовых комплекса по наличию генетических барьеров. Было установлено (l. c.), что в проростках *T. timopheevi* Zhuk. и его дикорастущего сородича *T. araraticum* Jakubz. образуются изоформы кислой фосфатазы, контролируемые геномом *B*, и не выявляются изоформы, характерные для генома *A*. В проростках всех таксонов комплекса *T. turgidum* (L.) Thell. (группа эммеров), включая формы дикорастущего палестинского тетраплоида *T. dicoccoides* (Кюерн.) Aaronsohn, наоборот, четко выявляются две главные изоформы кислой фосфатазы, контролируемые геномом *A*, тогда как изоформы фосфатазы, характерные для генома *B*, относительно менее активны.

В связи с этими данными напрашивается гипотеза, по которой в проростках *T. timopheevi* Zhuk. s. lat. селективно подавлены локусы генома *A*, контролирующего образование двух главных изоформ кислой фосфатазы, а в проростках *T. turgidum* (L.) Thell. частично подавлены соответ-

ствующие локусы на гомеологичном геноме *В*. Другими словами, предполагается, что у тетраплоидных пшениц наблюдается селективное подавление образования в проростках геном-специфических изоформ кислой фосфатазы, что является видовым признаком и соответствует подразделению таксонов тетраплоидной пшеницы на два видовых комплекса.

Биосинтез ферментов в проростках растений представляет собой результат начавшейся при прорастании реализации генетической информации, заключенной в нуклеотидной последовательности ДНК генома зародыша. За последние годы накопилось много данных (см. обзоры: Хавкин, 1969; Scandalios, 1969) о специфичном изменении активности и фракционного состава ряда ферментов в ходе прорастания и развития проростков. В том числе обнаружены (Яска, 1972; Alexandrescu, Hagita-Călin, 1970; Bhatia, Nilson, 1969; Маско и др., 1967; Sequi и др., 1970) значительные количественные и качественные сдвиги в наборе электрофоретически выявляемых множественных молекулярных форм (изоформ) ряда ферментов при прорастании гексаплоидной пшеницы. Эти данные свидетельствуют о том, что реализация генетической информации при прорастании и в ходе дальнейшего онтогенетического развития подчиняется определенной регуляции со стороны самого генома.

В настоящей работе ставится цель изучить регуляцию состава множественных молекулярных форм некоторых ферментов (кислой фосфатазы, пероксидазы, эстеразы и лейцинаминопептидазы) в течение прорастания и на первых этапах роста проростков *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. и *T. timopheevi* Zhuk. s. str., принадлежащих к двум генетически изолированным видовым комплексам тетраплоидных пшениц.

Материал и методика

Растительный материал. В опытах использованы местная репродукция образца *Triticum timopheevi* Zhuk. (s. str.), полученного от Л. Л. Декапрелевича (Тбилиси), и репродукция образца К-21582 *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl., полученного из Всесоюзного н.-и. института растениеводства им. В. И. Вавилова.

Промытые 96%-ным спиртом семена стерилизовались 10%-ным раствором H_2O_2 и проращивались в темноте при 25°C на листах фильтровальной бумаги, смоченных дистиллированной водой или растворами испытываемых соединений. Зародыши из непроросших семян выделялись после их 18-часового замачивания в дистиллированной воде при 0—2°.

Ферментные экстракты готовились гомогенизацией промытых дистиллированной водой 200—300 мг навесок изолированных зародышей и органов проростков пшеницы на холоде с 1,5 мл буферной смеси, состоящей из 0,05 М трис-оксиметиламинометана (трис), 0,04 М аскорбиновой кислоты, 0,001 М ЭДТА- Na_2Mg и 0,005 М цистеина. Гомогенаты центрифугировались в рефрижераторной центрифуге при 18 000 *g* в течение 20 мин. Центрифугаты сливались в пробирки, содержащие по 40 мг сефадекса Г-200 и 150 мг сахарозы, и хранились в замороженном виде.

Электрофорез экстрактов в полиакриламидном геле проводился в основном по методике Б. Дэвиса (Davis, 1964) с модифицированным составом геля и буферных растворов.

Гели для фракционирования в анионной системе готовились фотополимеризацией свежеприготовленного раствора, содержащего 10% акриламида, 0,15% N,N' -метиленбисакриламида, 0,25 М трис, 0,075 М HCl , 0,2% триэтанолamina и 0,5 мг% рибофлавин-5'-фосфата.

Электродные буферы для анионной системы: катодный буфер содержал 0,08 М глицин и 0,01 М трис, а анодный электролитом служил 0,1 М трис-ацетатный буфер с исходным рН 8,9.

Гели для фракционирования в катионной системе получали фотополимеризацией свежеприготовленной смеси следующего состава (Яска, 1972): 8% акриламида, 0,16% N,N'-метиленабисакриламида, 0,004 M ЭДТА, 0,15 M LiOH, 0,35 M CH₃COOH и 0,8 мг% рибофлавин-5'-фосфата. Анодный буфер катионной системы содержал 0,08 M β-аланин и 0,03 M CH₃COOH, а катодным электролитом служила 4%-ная CH₃COOH.

Гистохимическое выявление ферментов. Для выявления гидролазы (кислой фосфатазы, эстеразы и лейцинаминопептидазы) 2,0 мл 0,02 M холодного (2—5°) раствора дигидрохлорида *o*-дианизидина в 0,6 н. HCl диазотировали добавлением при перемешивании 0,2 мл холодного 7%-ного NaNO₂ и оставляли на холоде. Непосредственно перед окрашиванием к обесцвечившейся диазосмеси добавляли 20 мл раствора, содержащего 11,6 г/л малеиновой кислоты и 12,0 г/л KOH, что дает буферную смесь с конечным рН около 5,2. В полученную смесь вводили 0,2 мл раствора одного из следующих субстратов: 1) 1-нафтилацетат (10 мг/мл, в спирте) для выявления эстеразы, 2) 1-нафтилфосфат (20 мг/мл в спирте) для кислой фосфатазы, 3) гидрохлорид L-лейцил-2-нафтиламида (20 мг/мл в воде) для лейцинаминопептидазы. Гели после электрофореза инкубировали сначала 20—30 мин в 0,1 M малеинатном буфере с рН 5,8, а затем в описанной реакционной смеси до появления коричнево-красных зон на местах локализации гидролаз в гелях. Окрашенный фон удаляли выдерживанием гелей в смеси CH₃COOH-C₂H₅OH-H₂O при соотношении 5 : 20 : 75, соответственно. Полученные энзимogramмы эстеразы и кислой фосфатазы можно продолжительное время хранить в этой смеси; зоны лейцинаминопептидазы при стоянии обесцвечиваются.

Пероксидазная активность выявлялась путем инкубации гелей в течение 20 мин сначала в 20 мл 0,2 M ацетатного буфера (рН 4,6—4,8) (в случае разделения белков в анионной системе), затем в 20 мл смеси 0,001 M *o*-дианизидингидрохлорида и 0,001 M пирокатехина в 0,2 M ацетатном буфере, куда через 20 мин добавляли 0,4 мл 1,5%-ной H₂O₂.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены на рис. 1—4 в виде энзимogramм, т. е. в виде фотографий полиакриламидных гелей, окрашенных после электрофореза гистохимическими методами для выявления локализации ферментов. Для более точного описания результатов обнаруженные фракции ферментов обозначены по дистанциям миграции (D_m), выраженным в условно выбранных единицах по шкале на левой стороне каждого рисунка.

Кислая фосфатаза. Как видно из энзимogramм *A1* и *B1* на рис. 1, в зародышах непроросших семян обоих таксонов тетраплоидных пшениц обнаруживаются две высокоактивные фракции кислой фосфатазы (D_m 1,3 и 3,2). Те же фракции наблюдаются и на энзимogramмах (*A2* и *B2*) для зародышей после 18-часового проращивания при 25°. Эти две фракции хорошо различаются между собой по своим электрофоретическим подвижностям, которые, однако, сходны для обоих таксонов.

В ходе дальнейшего прорастания, как видно из энзимogramм на рис. 1, наблюдаются существенные качественные и количественные сдвиги в составе электрофоретически выявляемых изоформ (фракций) кислой фосфатазы. Прежде всего, малоподвижная фракция фосфатазы с D_m 1,3 полностью исчезает в органах проростка. Активность второй, более подвижной фракции фосфатазы зародыша с D_m 3,2 в проростках значительно снижается, а на энзимogramмах корней становится едва заметной. Не исключено, что в проростках образуется новая изоформа фосфатазы,

случайно совпадающая по электрофоретической подвижности с более подвижной изоформой зародыша.

Исчезновение одной или обеих изоформ фосфатазы зародыша при прорастании сопровождается появлением в проростках ряда новых изоформ с более высокими электрофоретическими подвижностями, которые становятся доминирующими фосфатазами в молодых вегетативных органах проростка пшеницы. Наблюдаемые сдвиги в составе изоформ фосфатазы происходят довольно быстро и в течение ограниченного периода прорастания. Так, в органах 71-часовых проростков уже имеется набор основных изоформ фосфатазы, который в ходе дальнейшего роста проростка подвергается уже менее существенным, в основном количественным сдвигам в относительной активности изоформ.

В то время как зародыши *T. dicocum* и *T. timopheevi* по составу изоформ кислой фосфатазы не различаются, на энзимограммах органов проростков между этими двумя видами выявляются уже четкие различия. Для *T. dicocum*, как и других линнеонов тетраплоидных пшениц группы эммера, характерно образование в проростке набора последовательно расположенных на энзимограмме изоформ фосфатазы (изофосфатаз) со значениями D_m около 3,4, 3,8, 4,2 и 4,5 на рис. 1А. В наших предыдущих работах показано (Jaaska, 1969; Jaaska, Jaaska, 1970), что две изоформы кислой фосфатазы тетраплоида *T. dicocum*, имеющие D_m 3,4 и 3,8, по электрофоретическим подвижностям близки двум главным изофосфатазам проростков диплоидной пшеницы *T. boeoticum* Boiss., которая является донором генома *B* в полиплоидные пшеницы. Предполагаемый донор второго генома *B* в тетраплоидные пшеницы — *Aegilops speltoides* Tausch — имеет в проростках дублет изофосфатаз, который, как показано нами ранее (l. c.), электрофоретически сходен с наиболее быстро движущимися изофосфатазами тетраплоидов, т. е. с изофосфатазами *T. dicocum*, имеющими D_m 4,2 и 4,5 на рис. 1А.

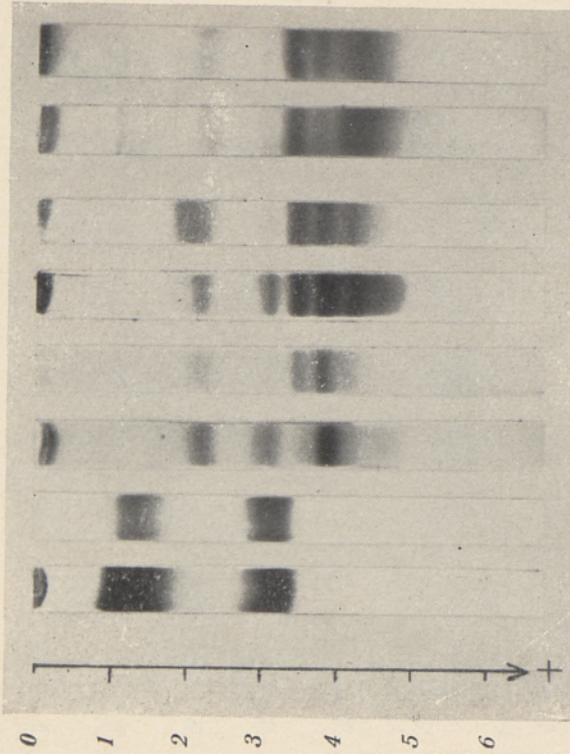
В ходе прорастания четыре основные изоформы фосфатазы образуются в проростках *T. dicocum* не одновременно, а в определенной последовательности. В колеоптилях 46-часовых проростков, как видно по энзимограмме АЗ на рис. 1, доминирует одна изофосфатаза генома *A* с D_m 3,8, тогда как вторая изофосфатаза генома *A* с D_m 3,4, как и обе изофосфатазы генома *B* с D_m 4,2 и 4,5, едва заметны. На энзимограмме А4 для корневой 46-часовых проростков видны обе изофосфатазы генома *A*, хотя и здесь изоформа с D_m 3,8 более интенсивно окрашена, т. е. более активна. На энзимограммах 71-часовых проростков *T. dicocum* (А5 и А6 на рис. 1) интенсивно окрашены обе изофосфатазы генома *A* и одна изофосфатаза генома *B* (с D_m 4,2), тогда как вторая, более быстро движущаяся изофосфатаза генома *B* с D_m 4,5 относительно слабо окрашена на энзимограмме колеоптиля (А5) и не выявляется на энзимограмме корня (А6).

В предыдущих работах (Jaaska, 1969; Jaaska, Jaaska, 1970) также четко выявлялись обе изофосфатазы генома *A* и только одна, медленнее движущаяся изофосфатаза генома *B* в 4—5-дневных проростках большинства изученных таксонов (линнеонов) гексаплоидных пшениц и тетраплоидных пшениц группы эммера.

В листьях и стеблях 7-дневных этиолированных проростков *T. dicocum*, как показывают энзимограммы А7 и А8 на рис. 1, выявляются изофосфатазы, контролируемые обоими геномами. При этом две изофосфатазы генома *A* электрофоретически разделяются четко, тогда как две близкие расположенные изофосфатазы генома *B* на энзимограммах сливаются в одну фракцию.

В ходе дальнейшего развития растения количественное соотношение изофосфатаз, контролируемых двумя составными геномами тетраплоида

А



Б

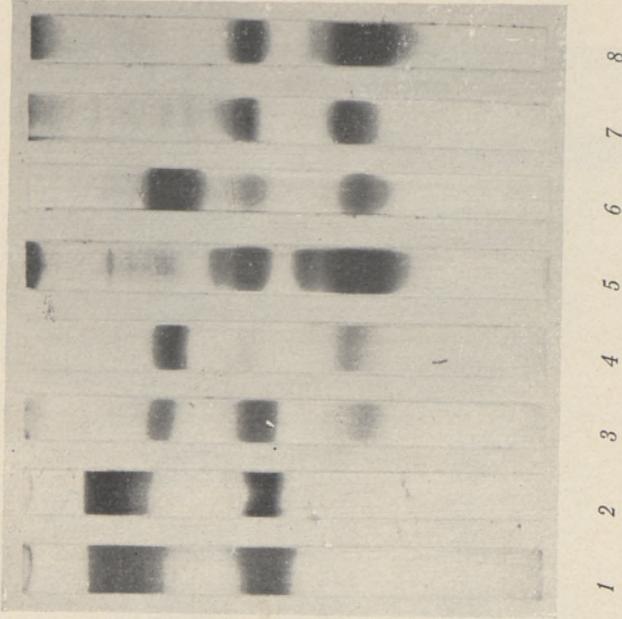


Рис. 1. Энзимогаммы кислой фосфатазы *T. discolor* (А) и *T. timortheevi* (Б): 1 — покоящийся зародыш, 2 — зародыш после 18 ч проращивания, 3 — колеоптиль 46-часового проростка, 4 — корни 46-часового проростка, 5 — колеоптиль с первым листом 71-часового проростка, 6 — корни 71-часового проростка, 7 — лист 7-дневного проростка, 8 — стебель 7-дневного проростка.

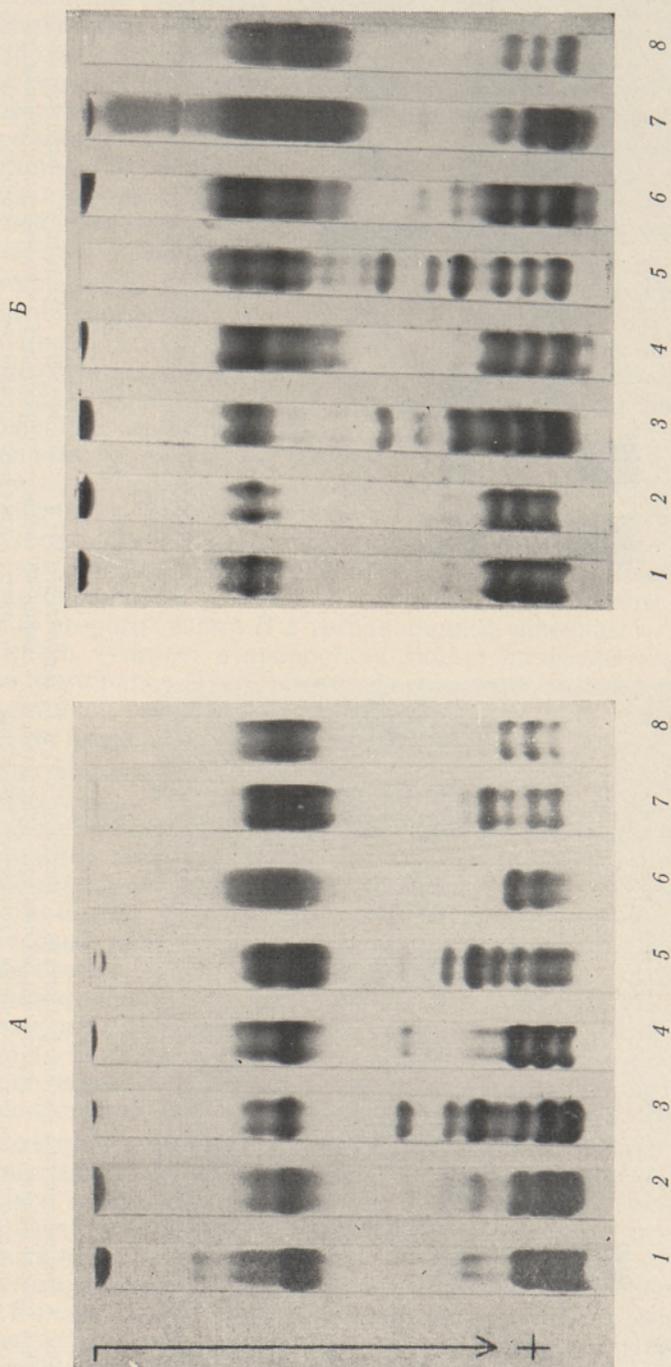


Рис. 2. Энзимогаммы эстеразы *T. discossus* (А) и *T. timorheevi* (Б). Обозначения см. рис. 1.

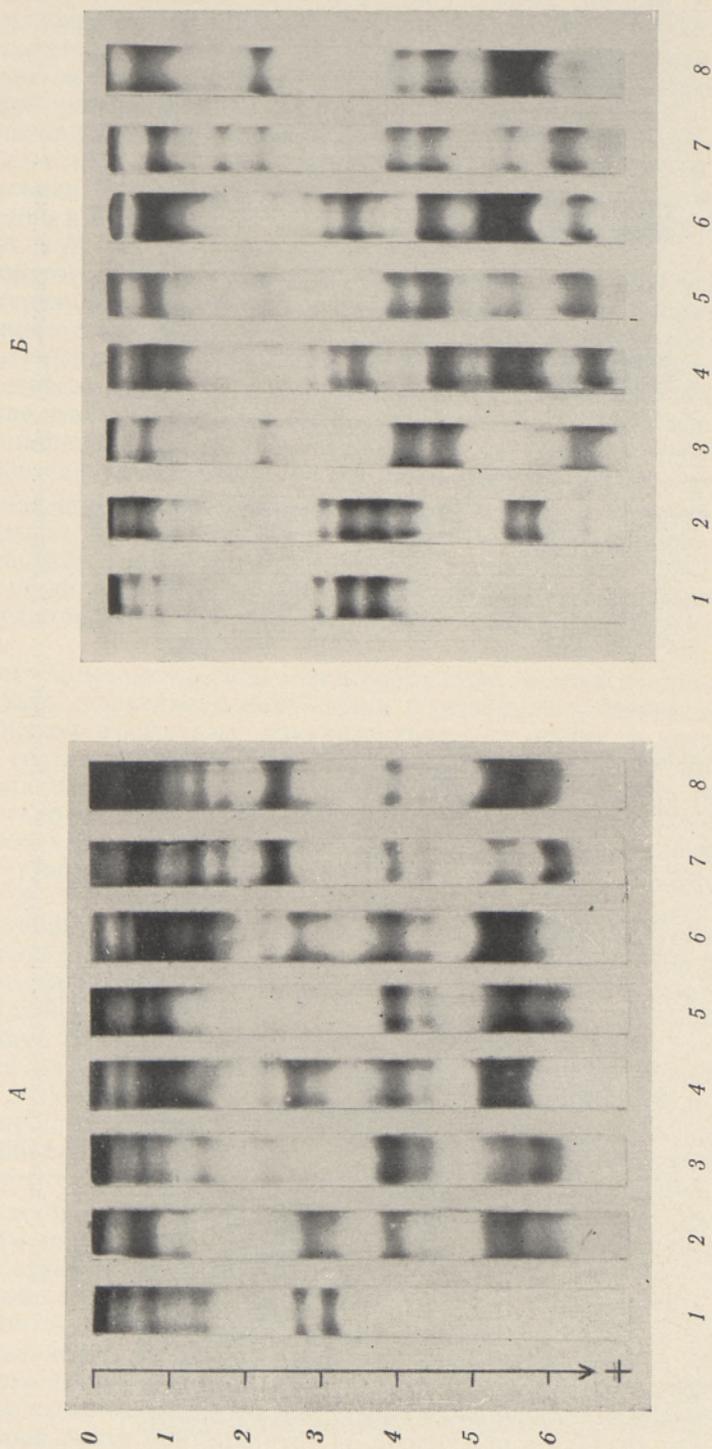


Рис. 3. Электрограммы анодных пероксидаз *T. discolor* (А) и *T. timopheevi* (Б). Обозначения см. рис. 1.

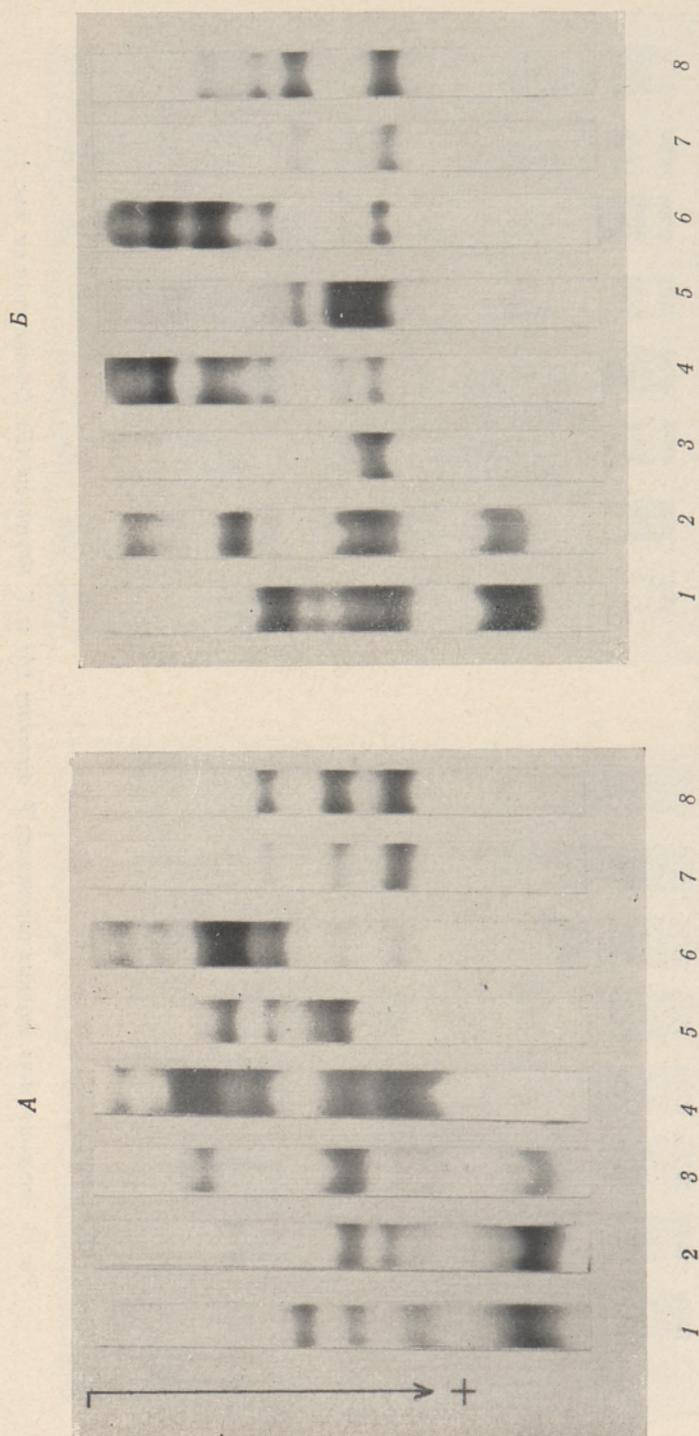


Рис. 4. Энзимограммы катодных пероксидаз *T. discosus* (A) и *T. timotheevi* (B). Обозначения см. рис. 1.

продолжает изменяться. Так, на энзимограммах листьев *T. dicoccum* в фазе кущения четко выявляется лишь дублет изофосфатаз генома *A* и в результате энзимограмма фосфатазы листьев тетраплоида *T. dicoccum* оказывается качественно неотличимой от энзимограммы фосфатазы диплоидной пшеницы.

Вышеописанные результаты свидетельствуют о том, что образование отдельных изоформ фосфатазы в ходе развития и роста проростков тетраплоида *T. dicoccum* подвергается регуляции, причем наблюдаются изменения в относительной активности фосфатаз, контролируемых геномами *A* и *B*.

У другого вида тетраплоидной пшеницы *T. timopheevi* прорастание характеризуется прогрессирующим образованием в тканях проростка активности фосфатазы, которая по электрофоретической подвижности на энзимограммах (рис. 1Б) совпадает с дублетом изофосфатаз современного носителя генома *B* — диплоида *Aegilops speltoides*. Как уже отмечено, две изофосфатазы генома *B* из-за близких значений электрофоретической подвижности трудно различимы и на большинстве энзимограмм выявляются гистохимически в виде одной широкой полосы активности.

Менее подвижный дублет изофосфатаз генома *A*, который четко обнаруживается у *T. dicoccum*, в проростках *T. timopheevi* отсутствует. В результате энзимограмма кислой фосфатазы проростков *T. timopheevi* оказывается качественно сходной с энзимограммой фосфатазы проростков предполагаемого диплоидного донора генома *B* — *Aegilops speltoides* Tausch.

Полученные результаты можно объяснить, исходя из уже упомянутой гипотезы о селективном подавлении (супрессии) у тетраплоидных пшениц локусов фосфатазы, локализованных на одном из двух гомеологических составных геномов аллотетраплоида. Так, у *T. timopheevi* полностью подавлены локусы (или локус) изофосфатаз генома *A* и реализуется только информация гомеологичных локусов генома *B*. У *T. dicoccum*, наоборот, наблюдается подавление в различной степени локусов изофосфатаз генома *B* при высокой активности гомеологичных локусов генома *A*.

Альтернативной возможностью интерпретации результатов является допущение у тетраплоидных пшениц мутационных дефектов структурных генов изофосфатаз, приводящих к образованию полностью инактивных фосфатазных белков генома *A* у *T. timopheevi*, а у *T. dicoccum* — фосфатаз генома *B* с пониженной удельной активностью. Такая интерпретация кажется нам менее правдоподобной, так как не позволяет объяснить сдвиги в активности изофосфатаз генома *B*, наблюдаемые в ходе развития проростка *T. dicoccum*. Кроме того, полную инактивацию одновременно обеих изофосфатаз генома *A* у *T. timopheevi* одной мутацией можно допустить лишь в случае детерминирования обеих общим цистроном.

К настоящему времени применением нуллисомиков гексаплоидной пшеницы доказана (Brewer и др., 1969) локализация генетической информации, ответственной за образование обеих изофосфатаз дублета, на хромосоме 4 гомеологичных геномов *B* и *D*. Однако остается невыясненным, контролируется дублет изофосфатаз двумя локусами или одним. Наши данные о различной скорости образования в ходе прорастания *T. dicoccum* двух изофосфатаз генома *A* косвенно свидетельствуют в пользу их детерминации двумя разными локусами. При этом возможно, что второй локус контролирует не первичную структуру второй изофосфатазы, а модификацию одной изофосфатазы в другую.

Наблюдаемое полное доминирование у *T. timopheevi* локусов изофосфатаз генома *B* над гомеологичными локусами генома *A* и онтогенетиче-

скую регуляцию активности локусов изофосфатаз генома *B* у *T. dicoccum* мы склонны объяснить изменениями не в структурных, а скорее в регуляторных генах.

Доминирование макроморфологических признаков у внутривидовых и межвидовых растительных гибридов хорошо известно, хотя молекулярно-генетические основы этого явления до сих пор не раскрыты. Что касается наследования электрофоретически различимых изоферментов у растительных гибридов, то в большинстве случаев установлено кодоминантное проявление активности аллелей обоих родителей (см. обзор: Scandalios, 1969). Кодоминантное проявление активности изофосфатаз гомеологичных локусов *A* и *D* наблюдается (Jaaska, 1969; Jaaska, Jaaska, 1970) у гексаплоидных пшениц.

Описанная нами полная инактивация локусов изофосфатаз генома *A* у *T. timopheevi* при высокой активности гомеологичных локусов генома *B* показывает, что кодоминантное наследование изоферментов наблюдается не всегда. В последние годы в литературе появились и иные сообщения о явлении доминирования при наследовании ферментов у растительных гибридов. Так, у внутривидовых гибридов кукурузы наблюдался (Chao, Scandalios, 1971) переход в ходе созревания семян и прорастания от полного доминирования к кодоминантному наследованию изоферментов α -амилазы, кодируемых аллельными генами. У рецiproкных межвидовых гибридов между *Nicotiana tabacum* и *N. glauca* недавно обнаружено (Kawashima, Wildman, 1972) полное доминирование генов *N. tabacum* для синтеза фермента рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы.

Эти данные показывают, что у растительных гибридов и полиплоидов, кроме кодоминантного наследования изоферментов, иногда встречается супрессия и связанное с последней доминирование, частичное или полное, одного из гомологичных генов (аллелей) или одного из гомеологичных локусов (гомеоаллелей), детерминирующих структуру ферментов и других белков.

Эстераза. На энзимограммах эстераз тетраплоидных пшениц, приведенных на рис. 2А и 2Б, наиболее четкими фракциями представлена серия быстро движущихся эстераз. Для обоих тетраплоидов характерен триплет быстро движущихся эстераз, который выявляется в высокоактивном виде уже в покоящемся зародыше и сохраняется при прорастании в вегетативных органах, хотя относительная интенсивность окрашивания (активность) отдельных фракций триплета и подвергается изменениям. Кроме того, в колеоптилях молодых проростков появляются или усиливаются, в дополнение к триплету быстро движущихся эстераз, некоторые изостеразы. В ходе прорастания увеличивается также активность эстераз со средней электрофоретической подвижностью, которые, однако, методом диск-электрофореза разделяются нечетко.

Перестройки в наборе изоформ эстераз, которые наблюдаются в ходе прорастания пшениц, однако, менее значительны по сравнению со сдвигами в составе изоформ фосфатазы и пероксидазы. В отличие от последних двух ферментов основные изоформы эстеразы покоящегося зародыша при прорастании не исчезают, а сохраняются и в вегетативных органах проростка.

Пероксидаза. Пероксидазной активностью в проростках пшеницы обладает множество белков с весьма различными изоэлектрическими точками и другими физико-химическими свойствами. Это заставляет пользоваться для полного выявления всего набора изоформ пероксидазы двумя разными системами электрофореза в полиакриламидном геле — анионной и катионной системами. Для более удобного описания резуль-

татов мы условно подразделяем изоформы пероксидазы на анодные и катодные. Анодными мы называем изоформы пероксидазы кислого и нейтрального характера, обладающие отрицательным зарядом в щелочной среде и движущиеся в сторону анода в анионной системе электрофореза. Катодными называются пероксидазы более щелочного характера, движущиеся в сторону катода в слабокислой среде катионной системы электрофореза.

Энзимограммы **анодных пероксидаз** проростков *T. dicoccum* и *T. timopheevi* представлены соответственно на рис. 3А и 3Б. На энзимограмме 3А1 для непроросшего зародыша *T. dicoccum* наряду с нечетко разделенными малоподвижными фракциями выделяются две изопероксидазы с D_m 2,8 и 3,1. Уже на начальных этапах прорастания в зародыше появляется ряд новых изоформ анодной пероксидазы, характеризующихся более высокой электрофоретической подвижностью, чем изопероксидазы покоящегося зародыша. Так, на энзимограммах для зародыша *T. dicoccum* после 18-часового прорастания (3А2) видны новые изопероксидазы со значениями D_m около 4,0, 4,5, 5,3 и 5,6, которые в ходе дальнейшего развития проростка подвергаются лишь количественным сдвигам. Кроме того, в надземных органах проростка, но не в корнях, появляется еще одна, наиболее быстро движущаяся изоформа пероксидазы с D_m около 6,0 и исчезает дублет изопероксидаз покоящегося зародыша. В результате колеоптиль с первым листом и корень различаются по составу изоформ анодных пероксидаз (энзимограммы 3—6 на рис. 3А). На энзимограммах листьев и стеблей более старых, 7-дневных проростков (3А7 и 3А8), кроме быстродвижущихся изоформ, четче, чем в более молодых проростках, выделяются медленнодвижущиеся изоформы с D_m 1,5, 1,8 и 2,5.

На энзимограмме анодной пероксидазы непроросшего зародыша *T. timopheevi* также выделяются две интенсивно окрашенные изопероксидазы со средней электрофоретической подвижностью, которая, однако, достоверно выше, чем у соответствующих изопероксидаз зародыша *T. dicoccum*. В ходе прорастания у *T. timopheevi*, как и у *T. dicoccum*, наблюдается образование новых изопероксидаз с более высокой подвижностью по сравнению с эмбриональными. Новообразующиеся при прорастании изопероксидазы электрофоретически сходны для обоих таксонов пшениц, что обуславливает и общее сходство их энзимограмм пероксидазы. Основные качественные различия между пероксидазами двух тетраплоидов заключаются в различной электрофоретической подвижности эмбриональных изоформ пероксидазы и одной изопероксидазы 7-дневных проростков с D_m около 2,5 у *T. dicoccum* и около 2,0 у *T. timopheevi*. Остальные обнаруженные различия между двумя таксонами относятся к количественным и отражают различия в активности отдельных изопероксидаз.

Энзимограммы **катодных пероксидаз** представлены на рис. 4А и 4Б. Из приведенных данных видно, что в ходе прорастания фракционный состав катодных пероксидаз, как и анодных, подвергается существенным перестройкам. Уже в течение первых двух-трех суток в проростках исчезают две фракции с высокой и со средней электрофоретической подвижностью, которые были высокоактивны в непроросшем зародыше. Это сопровождается образованием в вегетативных органах, корнях, стебле и первичном листе ряда новых катодных изопероксидаз.

Сравнение энзимограмм на рис. 4 показывает, что два тетраплоида — *T. dicoccum* и *T. timopheevi* — весьма четко различаются по энзимограммам катодных пероксидаз как на стадии покоящегося зародыша, так и на стадии 7-дневного проростка.

Сходные изменения во фракционном составе анодных и катодных пероксидаз при прорастании описаны (Яаска, 1972; Маско и др., 1967; Sequi и др., 1970) для гексаплоидной пшеницы. Имеющиеся данные говорят о том, что в непроросшем зародыше более активны катодные изопероксидазы щелочной природы. В наших опытах для четкого гистохимического выявления активности катодных пероксидаз непроросшего зародыша в полиакриламидных гелях потребовалось меньшее количество ферментного экстракта зародышей, чем для обнаружения анодных пероксидаз. При прорастании активность и число катодных пероксидаз в колеоптите уменьшается, что сопровождается увеличением числа и активности анодных изопероксидаз кислой природы. В ходе дальнейшего роста в органах проростка образуются новые катодные изопероксидазы, отличающиеся от изопероксидаз зародыша электрофоретической подвижностью, тогда как состав основных анодных изопероксидаз уже существенно не меняется.

Физиологическое значение описанных закономерных изменений в составе и относительной активности изопероксидаз, которые наблюдаются при прорастании и в ходе роста проростка пшеницы, остается невыясненным.

Механизмы образования ферментов при прорастании. Из полученных данных следует, что переход семян к прорастанию характеризуется быстрой и значительной перестройкой ферментного аппарата зародыша. Уже в течение первых 24—48 ч прорастания семян в тканях проростка образуются новые изоформы фосфатазы, эстеразы и пероксидазы, что сопровождается исчезновением или уменьшением активности изоформ фосфатазы и пероксидазы, характерных для покоящегося зародыша.

Образование при прорастании новых изоформ фермента может быть обусловлено либо их биосинтезом *de novo*, либо превращением активных или неактивных предшественников зародыша в новые молекулярные формы, характерные для тканей проростка. Наиболее достоверным критерием биосинтеза *de novo* служит доказательство включения меченой изотопом аминокислоты в состав ферментного белка. Более доступным способом, который дает возможность косвенно судить о способах новообразования ферментов, является использование специфических ингибиторов транскрипции ДНК генома и ингибиторов трансляции и-РНК на рибосомах.

Для получения сведений о механизмах образования новых изофосфатаз и изопероксидаз при прорастании тетраплоидных пшениц мы использовали ингибитор транскрипции — актиномицин Д (Goldberg, Friedman, 1971) и ингибитор трансляции — хлоральгидрат (McMahon, Blaschko, 1971). Сухие семена *T. dicoccum* замачивали в течение 10—12 ч при +2° в растворах ингибитора и затем проращивали в темноте при +25° в течение двух суток на фильтровальной бумаге, обильно смоченной раствором хлоральгидрата (10 мМ) или актиномицина Д (30 мг/л).

Оба ингибитора в использованных концентрациях практически полностью подавляли развитие зародыша в проросток. Хлоральгидрат в значительной степени, хотя и не полностью, подавлял образование новых изоформ фосфатазы и пероксидазы, характерных для тканей проростка. Это свидетельствует в пользу того, что биосинтез белка является необходимым условием для образования при прорастании новых изоформ фосфатазы и пероксидазы.

Следует, однако, отметить, что подавление образования новых изоформ фермента ингибитором трансляции — это не окончательный, а лишь косвенный критерий биосинтеза *de novo*. Имеется возможность подавления ингибитором трансляции образования какого-то другого белка, необ-

ходимого для превращения предшественников фермента зародыша в новые молекулярные формы, характерные для проростка.

Недавно с использованием метки дейтерием доказано (Austine и др., 1970), что новые изоформы пероксидазы, выявляющиеся при прорастании семян ячменя, образуются не из неактивных предшественников, а синтезируются *de novo*, тогда как биосинтез изопероксидаз, характерных для непроросшего зародыша и исчезающих при прорастании, не происходит. Учитывая большое сходство энзимограмм пероксидазы проростков ячменя и пшеницы (неопубликованные данные), можно предполагать, что и при прорастании пшеницы происходит биосинтез изопероксидаз *de novo*.

Опыты с использованием изотопов для выяснения механизма образования изоформ фосфатазы еще не ставились, однако совокупность полученных нами косвенных данных говорит в пользу предположения, что геном-специфические изофосфатазы тетраплоидных пшениц образуются при прорастании в результате биосинтеза *de novo*.

Актиномицин Д (30 мг/л) в наших опытах полностью подавлял образование новых геном-специфических изофосфатаз, характерных для органов проростка *T. dicoccum*, и задерживал исчезновение фракций изофосфатаз, характерных для зародыша. Это указывает на то, что для биосинтеза геном-специфических изофосфатаз проростка требуется транскрипция генома с образованием новой и-РНК.

В отличие от фосфатаз образование новых анодных изопероксидаз, характерных для тканей проростка, при проращивании семян на растворе актиномицина Д заметно не подавлялось, хотя образование проростка и было подавлено. Наиболее вероятной интерпретацией этого кажется нам предположение, что новые изопероксидазы проростка образуются на матрицах «долгоживущей» и-РНК, наличие которой в зародыше пшеницы установлено рядом исследователей (Marcus, Feely, 1964; Chen и др., 1968а, б).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения, что регуляция образования новых изофосфатаз и изопероксидаз тканей проростков при прорастании пшениц происходит на уровне транскрипции и трансляции генетической информации.

Выводы

Переход семян пшениц к прорастанию характеризуется быстрой и значительной перестройкой ферментного аппарата зародыша. Уже в течение первых 24—48 ч прорастания семян наблюдается образование в тканях проростка новых изоформ фосфатазы, эстеразы и пероксидазы. Это сопровождается исчезновением или уменьшением активности в проростке изоформ фосфатазы и пероксидазы, характерных для покоящегося зародыша. Основные изоформы эстеразы зародыша сохраняются высокоактивными и в тканях проростка.

T. dicoccum и *T. timopheevi* имеют в зародыше две электрофоретически сходные для обоих видов фракции кислой фосфатазы, но различаются по изофосфатазам вегетативных органов проростка. В проростке *T. dicoccum* высокоактивны две изофосфатазы, контролируемые геномом А, и наблюдается подавление образования изофосфатаз, контролируемых геномом В. У *T. timopheevi*, напротив, наблюдается полное доминирование локусов изофосфатаз генома В над гомеологичными локусами генома А, в результате чего в проростках образуются лишь изофосфатазы, кодируемые геномом В.

С помощью ингибитора биосинтеза РНК — актиномицина Д — показано, что для образования изофосфатаз проростка необходима транс-

крипция генома, тогда как для образования новых изоферментов требуется транскрипция не требуется и последние, предположительно, образуются на матрицах «долгоживущей» и-РНК зародыша. Ингибитор биосинтеза белка хлоральгидрат частично подавлял образование при прорастании новых изоферментов и изоферментов.

ЛИТЕРАТУРА

- Мак Кей Дж., 1968. Генетические основы систематики пшениц. С.-х. биология 3 (1) : 12—25.
- Хавкин Э. Е., 1969. Индуцированный синтез ферментов в процессе роста и морфогенеза растений. М. : 1—168.
- Яаска Вильве, 1972. Действие некоторых ростовых веществ на изоферменты пероксидазы при прорастании пшеницы. Изв. АН ЭстССР, Биол. 21 (2) : 130—140.
- Alexandrescu V., Hagima-Călin I., 1970. Peroxidaza din griu in primele etape de crestire. Stud. si cerc. biochim. 13 (2) : 113—120.
- Austine W., Jacobsen J. V., Scandalios J. Q., Varnes J. E., 1970. Deuterium oxide as a density label of peroxidases in germinating barley embryos. Plant. Physiol. 45 (2) : 148—152.
- Bhatia C. R., Nilson J. P., 1969. Isoenzyme changes accompanying germination of wheat seeds. Biochem. Genet. 3 : 207—214.
- Brewer G. J., Sing Ch. F., Sears E. R., 1969. Studies of isozyme patterns in nullisomic-tetrasomic combinations of hexaploid wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64 (4) : 1224—1229.
- Chao S. E., Scandalios J. G., 1971. Alpha-amylase of maize: Differential allelic expression at the Amy-1 gene locus, and some physicochemical properties of the isozymes. Genetics 69 (1) : 47—61.
- 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., 1968b. 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.
- Goldberg I. H., Friedman P. A., 1971. Antibiotics and nucleic acids. Annual Rev. Biochem. 40 : 775—810.
- IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature. 1971. The Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes. Recommendations. Arch. Biochem. Biophys. 147 (1) : 1—3.
- Jaaska V., 1969. Electrophoretic studies of seedling phosphatases, esterases and peroxidases in the genus *Triticum* L. Eesti NSV TA Toimet. Biol. 18 (2) : 170—183.
- Jaaska Vello, 1971. Phylogenetic differentiation of tetraploid wheats. Eesti NSV TA Toimet. Biol. 20 (3) : 202—205.
- Jaaska V., Jaaska Vilve, 1970. Biochemical data on the origin of Transcaucasian endemic wheats. Eesti NSV TA Toimet. Biol. 19 (4) : 344—354.
- Kawashima N., Wildman S. G., 1972. Studies of fraction I protein. IV. Mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains the code for a chloroplast protein. Biochim. Biophys. Acta, 262 (1) : 42—49.
- Macko V., Honold H. R., Stahmann M. A., 1967. Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. Phytochemistry 6 (4) : 465—471.
- 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.
- Markert C. L., Whitl G. S., 1968. Molecular varieties of isozymes. Experientia, 1968, 24 (10) : 977—991.
- Markert C. L., Møller F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45 (5) : 753—763.
- McMahon D., Blaschko W., 1971. Chloral hydrate inhibits protein synthesis *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta, 238 (1) : 338—342.
- Scandalios J. G., 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochem. Genet. 3 (1) : 37—79.
- Sequi D., Marchesini A., Chersi A., 1970. Peroxidase isoenzymes in germinating wheat. In: Enzymes and Isoenzymes. Structure, Properties and Function. Proc. of the fifth FEBS meeting, Prague, July 1969, 18 : 297—303.

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

ENSÜMIDE MULTIMOLEKULAARSETE SÜSTEEMIDE REGULATSIOONIST
TETRAPLOIDSETE NISUDE IDANEMISEL

Resümee

Nisuseemnete idanemine põhjustab idu ensüümsüsteemides kiireid ja olulisi muutusi. Juba 24—48 esimese idanemistunni jooksul täheldatakse idandites mitme uue fosfaataasi, esteraasi ja peroksüdaasi isovormi moodustumist ning mitme idule iseloomuliku fosfaataasi ja peroksüdaasi isovormi kadumist või nende aktiivsuse vähenemist. Idu kolm põhilist isoesteraasi aga säilitavad oma kõrge aktiivsuse ka tõusmetes.

Nii *T. dicoccum*'i kui ka *T. timopheev*'i idus täheldati kaht ühesuguse elektroforeetilise liikuvusega happelist fosfaataasi. Samade liikide tõusmete fosfaataaside ensüogrammide aga erinevad tunduvalt. *T. dicoccum*'i tõusmetes on kõrge aktiivsusega kaks genoom *A* poolt kodeeritud isofosfaataasi, kusjuures kasvu jätkudes esinevad muutused genoom *B* poolt kontrollitavate isofosfaataaside moodustumises. *T. timopheev*'i puhul aga täheldati genoom *B* isofosfaataaside lookuste domineerimist genoom *A* homeoloogiliste lookuste üle, mistõttu tõusmetes sünteesuvad vaid genoom *B* poolt kodeeritud isofosfaataasid.

Katsed transkriptsiooni inhibiitori aktinomütsiin D-ga viitavad RNH biosünteesi vajalikkusele uute isofosfaataaside moodustumisel tõusmetes. Uute isoperoksüdaaside tekkeks nendes aga pole transkriptsioon vajalik ning võib oletada, et viimased sünteesuvad idus leiduva «maskeeritud» *i*-RNH matriitsil. Kloraalhüdraat kui valgu biosünteesi inhibiitor pärssis osaliselt uute isofosfaataaside ja isoperoksüdaaside teket idanemisel.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika InstituutToimetusse saanud
8. XII 1972

VILVE JAASKA, VELLO JAASKA

REGULATION OF MULTIMOLECULAR SYSTEMS OF ENZYMES
DURING THE GERMINATION OF TETRAPLOID WHEATS

Summary

Changes in the multiple molecular forms (isoforms) of acid phosphatase, esterase and peroxidase during the germination and seedling growth of the tetraploid wheats, *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. and *T. timopheevi* Zhuk., have been followed using polyacrylamide gel electrophoresis.

The germination of wheat seeds is characterized by rapid and considerable changes in the enzyme apparatus of the embryo. New isoforms of acid phosphatase, esterase and peroxidase appear in embryo and young seedling tissues during the first 24—48 hours of germination. This is accompanied by a disappearance or decrease in the activity of acid phosphatase and peroxidase isoforms characteristic of the quiescent embryo. However, the three major esterase isoforms of the ungerminated embryo maintain their high activity in seedling tissues.

The seed embryos contain two fractions of acid phosphatase, which are electrophoretically similar in *T. dicoccum* and *T. timopheevi*. The seedling tissues of the two species, however, differ in respect of their acid phosphatase electrophoretic patterns. In the seedlings of *T. dicoccum*, the two isophosphatases encoded by the genome *A* exhibit high activity, while the content of isophosphatases controlled by the genome *B* changes during the seedling growth. In the seedlings of *T. timopheevi*, on the contrary, only isophosphatases encoded by the genome *B* are formed, presumably due to a complete dominance of the phosphatase loci of the genome *B* over the homoelogenous loci of the genome *A*.

Experiments with actinomycin D — an inhibitor of transcription — indicated that RNA biosynthesis is required for the formation of new isophosphatases in the seedlings, but is not needed for the formation of seedling isoperoxidases which are suggested to be synthesized on the matrices of "masked" m-RNA of the ungerminated wheat embryo.

Chloralhydrate — an inhibitor of protein biosynthesis — partially suppressed the formation of new isophosphatases and isoperoxidases during germination.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and BotanyReceived
Dec. 8, 1972