

И. В. ЗЕЛЕНЕВА, Э. Е. ХАВКИН

**ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗА В РАСТУЩИХ КЛЕТКАХ
КОРНЯ КУКУРУЗЫ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 10 VIII 1970)

Переход клеток корня от деления к растяжению сопровождается усилением дыхания, интенсивность которого нарастает на протяжении всей фазы растяжения. Рост клеток в длину связан с заметной активацией гексозомонофосфатного шунта, однако гликолиз остается основным начальным путем дыхания даже после завершения роста клеток (1). Ферменты гликолитической цепи распада дыхательных субстратов в растущих органах растений систематически не изучались. Изменения активности некоторых ферментов гликолиза отмечены в растущем корне гороха (2,3) и надземной части проростков пшеницы (4), однако авторы этих работ не вычленили ткани с разным типом клеточного роста. Отмечено увеличение активности алкогольдегидрогеназы и новообразование лактатдегидрогеназы, сопровождающее рост клеток корня гороха и кукурузы (5, 6). Активность фруктозодифосфатальдолазы в расчете на клетку была одинаковой у coleoptилей кукурузы в фазе деления и растяжения, но резко уменьшалась после прекращения роста в длину (7) в отличие от клеток корня гороха, где увеличение активности этого фермента продолжалось после завершения фазы растяжения (3).

В настоящей работе определялась активность гликолитических ферментов в делящихся, растягивающихся и закончивших рост в длину клетках корня кукурузы (анализировали соответственно отрезки 0—2, 2—4 и 10—20 мм от кончика корня) и связь увеличения активности гликолитических ферментов с их новообразованием.

Семена кукурузы гибрид Буковинский 3 проращивали 48 час. при 27°. Замороженные твердой углекислотой отрезки корня растирали на холоду с 0,2 M раствором трис-HCl-буфера pH 8,3, содержащего 0,02 моля меркаптоэтанола, при соотношении ткани и буфера от 1:2 до 2:1 для разных отрезков корня. Гомогенат центрифугировали 25 мин. при 18 000 об/мин. и надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов: гексокиназы (ГК) (8) (2.7.1.1), глюкозофосфатизомеразы (ГФИ) (5.3.1.9.), фосфоглицераткиназы (ФГК) (2.7.2.3), фосфоэнолпируватдегидратазы (ФПД) (4.2.1.11), алкогольдегидрогеназы (АДГ) (10) (1.1.1.1) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (9) (1.1.1.27). Активность определяли по начальной скорости изменения поглощения НАД-H₂ и НАДФ-H₂ при 340 мμ и 25° в прямых или сопряженных реакциях и выражали в наномолях превращенного субстрата за 1 мин. на 1 г сырого веса, отрезок или клетку корня (1). Количество белка в ферментном экстракте определяли методом Лоури (11) после трехкратного переосаждения трихлоруксусной кислотой.

Мы использовали глюкозу фирмы «Полфа» (ПНР), ЭДТА фирмы «Хемапол» (ЧССР), трис-основание («Тризма») фирмы «Сигма» (США), имидазол фирмы «Флюка» (Швейцария), гексозофосфаты, тризофосфаты, НАД, НАД-H₂, НАДФ, АДФ и АТФ фирмы «Реанал» (ВНР), 2-меркапто-

этанол фирмы «Мерк» (ФРГ), восстановленный глутатион фирмы «Шухардт» (ФРГ), этанол и пируват отечественного производства, ферментные препараты глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и пируваткиназы фирмы «Реанал» (ВНР), ЛДГ фирмы «Берингер» (ФРГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы фирмы «Флюка» (Швейцария).

Ферментные профили дифференцированных тканей животных обычно характеризуют по величине активности ферментов (¹²) в расчете на единицу сырого веса.

Растяжение клеток корня приводит к увеличению оводненности протоплазмы и накоплению клетчатки. При этом постепенно снижается содержание экстрагируемого белка и активности

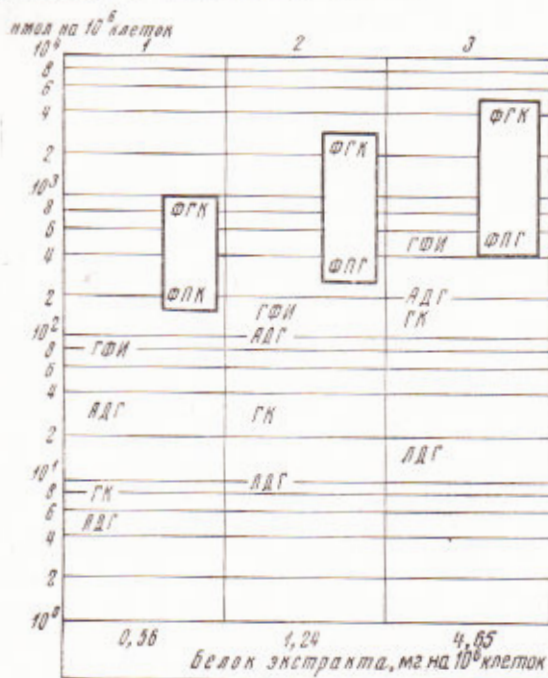


Рис. 1. Уровень гликолитических ферментов. 1 — меристема (0—2 мм от кончика), 2 — зона начального растяжения (2—4 мм), 3 — зрелые клетки (10—20 мм)

АДГ — втрое, а ГК — в пять раз. При дальнейшем растяжении клеток продолжается накопление растворимых белков и ферментов, особенно быстро повышается уровень ГФИ и ГК (рис. 1). Активность ферментов (в расчете на клетку) в 3—20 раз выше в закончивших рост клетках корня, чем в меристеме. Такое увеличение вряд ли может быть вызвано активацией предсуществующей латентной формы ферментов и скорее всего связано с новообразованием ферментных белков за период растяжения.

Для проверки этого предположения были поставлены опыты, в которых на корни тушью наносили метки на расстоянии 2 и 4 мм от кончика, после чего проростки помещали на фильтровальную бумагу, смоченную раствором ингибитора (синтеза белка актидиона-циклогексимида) в концентрации 0,4 мг/л. Степень подавления растяжения клеток между метками за 6 час. действия ингибитора составляла 51%, а накопление белка в отрезке между метками угнеталось на 68%.

Результаты опытов с актидионом представлены в табл. 2 в расчете на 1 отрезок (38·10³ клеток), поскольку число клеток в отрезке между метками за 6 час. не изменяется. Уровень ГФИ и ГК увеличивается за это время в 2,3 раза, а активность ФГК и особенно ФЛГ возрастает с

содержание экстрагируемого белка и активности шести ферментов гликолиза (табл. 1). Исключение составляет ГК, относительное содержание которой не изменяется при переходе клеток от деления к росту растяжением. Соотношение ФГК и ФЛГ — двух ферментов, входящих в группу ферментов гликолиза с постоянным соотношением (¹²), не изменяется в фазе деления и растяжения, а после прекращения роста клеток в длину несколько увеличивается, оставаясь, впрочем, в пределах порядка величины.

Переход клеток корня от деления к растяжению сопровождается удвоением (в расчете на клетку) содержания экстрагируемого белка и активности ФГК и ФЛГ; уровень ГФИ и ЛДГ увеличивается в полтора раза,

Таблица 1

Активность ферментов гликолиза в клетках корня кукурузы, нмол/мин на 1 г сырого веса *

Фаза роста отрезков корня	ГК	ГФН	ФГК	ФПГ	АДГ	ЛДГ	ФГК/ ФПГ	Белок ферментного аксратга, мг на 1 г сыр. веса
Деление (0—2 мм)	621 ± 81 (5)	6715 ± 980 (4)	70188 ± 7900 (4)	16217 ± 970 (3)	2454 ± 110 (4)	449 ± 57 (3)	4,3	47,32 ± 1,50 (3)
Растяжение (2—4 мм)	619 ± 78 (6)	2423 ± 220 (5)	29314 ± 2400 (6)	6186 ± 630 (6)	1717 ± 82 (3)	179 ± 38 (3)	4,7	22,32 ± 2,40 (3)
Закончившие рост клетки (10—20 мм)	306 ± 19 (5)	1263 ± 260 (5)	9254 ± 680 (4)	1162 ± 170 (5)	465 ± 100 (5)	41 ± 7 (5)	8,0	10,53 ± 0,55 (3)

* Квадратичная ошибка среднего из числа опытов (указано в скобках).

Таблица 2

Действие актидоина на увеличение активности ферментов гликолиза в растягивающихся клетках корня кукурузы, нмол/мин на 100 отрезков корня *

Вариант опыта	ГК	ГФН	ФГК	ФПГ	ФГК/ФПГ	Белок ферментного аксратга, мг на 100 отрезков
Исходный контроль (2—4 мм)	131 ± 16	638 ± 4	7261 ± 420	1536 ± 190	4,7	8,33 ± 0,45
Через 6 часов:						
Контроль (5—14 мм)	313 ± 30	1550 ± 200	12570 ± 740	1857 ± 130	6,8	16,8 ± 0,12
Актидоин (3—8,5 мм)	203 ± 48	956 ± 54	9021 ± 380	1445 ± 280	6,2	11,3 ± 0,49

* Квадратичная ошибка среднего из 3 опытов.

меньшей скоростью, что согласуется с данными, представленными на рис. 1. Актидион подавляет образование растворимых белков и увеличение активности ГК, ГФИ и ФГК на 60—67% и полностью — накопление ФПГ. Следует отметить, что прирост интенсивности дыхания подавлялся актидионом в тех же условиях на 55—60%. Такое сходство ингибирующего действия актидиона на накопление белка, усиление дыхания и увеличение активности гликолитических ферментов свидетельствует о синтезе ферментных белков *de novo*. Для ЛДГ аналогичные данные получены в тех же условиях с этионином (6).

Различная чувствительность синтеза ФГК и ФПГ к актидиону может указывать на известную независимость синтеза этих двух ферментов. Такое предположение вполне согласуется с увеличением соотношения ФГК и ФПГ после прекращения роста клеток в длину (табл. 1). В отличие от ФГК и ФПГ, активность которых продолжает увеличиваться с разной скоростью и в закончивших рост клетках корня кукурузы (рис. 1), уровень глицeralьдегид-3-фосфатдегидрогеназы, третьего фермента гликолитической группы с постоянным соотношением (12), в растущих и прекративших рост клетках корня гороха был одинаковым (9). Вероятно, накопление всех трех ферментов в ходе роста и дифференцировки клеток корня идет с разной скоростью, и соотношение их уровней может колебаться, так же как и в тканях животных, в пределах порядка величины.

Авторы выражают свою признательность проф. Ф. Э. Реймерсу за постоянное внимание к работе и О. М. Бабуриной, О. И. Молодук и А. И. Переляевой за помощь в проведении опытов.

Сибирский институт физиологии
и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
18 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Э. Е. Хавкин, Н. Н. Варакина, Физиол. раст., 16, 1064 (1969). 2 M. Gibbs, J. M. Earl, Plant Physiol., 34, 529 (1959). 3 M. W. Fowler, T. Ap Rees, Biochim. et biophys. acta, 201, 33 (1970). 4 A. M. Firenzuoli et al., Plant Physiol., 43, 260 (1968). 5 V. L. Riggio, Bull. Soc. ital. biol. sperim., 42, 1685 (1966). 6 Э. Е. Хавкин, Р. Т. Поликарпочкина и др., ДАН, 188, 1407 (1969). 7 Э. Е. Хавкин, Л. А. Подолякина, Физиол. раст., 16, 740 (1969). 8 A. P. Brown, J. L. Wray, Biochem. J., 108, 437 (1968). 9 Th. Bücher, F. Hoppe Seyler, H. Tiertelder, Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-chemischen Analyse, Aufl. 10, 6, Teil A, 1964. 10 E. A. Cossins et al., Phytochemistry, 7, 1125 (1968). 11 O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). 12 D. Pette, Naturwiss., 22, 597 (1965).