

И. В. ЗЕЛЕНЕВА

АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В РАЗНЫХ ТИПАХ СЕМЯДОЛЕЙ ПОКОЯЩИХСЯ СЕМЯН

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 19 VII 1971)

Семядоли цветковых растений, в которых формирование клеток заканчивается перед наступлением периода покоя, представляют удобный объект для сравнения потенциальных возможностей отдельных систем обмена веществ у представителей далеко отстоящих в систематическом отношении организмов. В качестве первого этапа сравнительного изучения метаболизма семядолей мы провели определение активности ферментов гликолиза. Были выбраны растения с различными функциями семядолей: из класса однодольных — кукуруза с гаусториальной функцией щитка, из класса двудольных — горох, растение с подземным типом прорастания, и огурец, у которого семядоли при прорастании выносятся на поверхность, зеленеют и превращаются в фотосинтезирующий орган (1). Семядоли этих растений заметно различаются и по составу запасных веществ, которые могут превращаться в дыхательные субстраты на ранних фазах прорастания семян.

Работы по изучению активности гликолитических ферментов в тканях покоящихся семян довольно малочисленны (2). Сопоставление результатов, полученных отдельными авторами, осложняется из-за применения разных методов исследования (3) и произвольного выбора ограниченного числа ферментов (4, 5). В противоположность этому на животных тканях в течение многих лет проводилось изучение гликолиза в сравнительном аспекте. Из последовательности гликолитических реакций удалось выделить связанную с обменом триозофосфатов группу ферментов, отношение активностей которых было постоянным или близким к постоянному у множества исследованных тканей: от различных мышц насекомых и млекопитающих, с одной стороны, до клеток пекарских дрожжей, с другой (6, 7). Этот квинтет ферментов гликолиза: триозофосфатизомераза, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФДГ), фосфоглицераткиназа (ФГК), фосфоглюкомутаза, фосфопируватгидратаза (ФПГ) — был назван группой с постоянным соотношением активностей — «константной группой» (8). Мы попытались сравнить активность гликолитических ферментов в трех типах семядолей и выяснить, применим ли принцип «константных групп» к растительным тканям.

Вычлененные из воздушно-сухих семян и тонко измельченные семядоли гороха (сорт Торсдаг), огурца (сорт Вязниковский) и щитки кукурузы (гибрид Буковинский 3) смешивали с двумя или тремя объемами охлажденного 0,2 М трис-НСl буфера, рН 8,3, содержащего 0,02 М 2-меркаптоэтанола, и настаивали при 2° в течение 2 час. Гомогенат центрифугировали 25 мин. при 18 000 g, в надосадочной жидкости определяли активность гликолитических ферментов оптическим методом на СФ-4А по начальному изменению оптической плотности НАД-Н и НАДФ-Н при 340 мμ и 25° в простых или сопряженных реакциях. Реакционные смеси составляли по Бюхеру (8) с некоторыми модификациями для гексокиназы (9), фосфофруктокиназы (10), глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы (11), алкогольдегидрогеназы (12); триэтаноламин-хлоридный буфер был заменен на трис-НСl-буфер. За единицу активно-

сти фермента принято количество наномолей субстрата, превращенное за 1 мин. Отсутствие деления клеток в покоящихся семядолях позволяет производить расчет активности на 1 г воздушно-сухого веса, что лишено физиологического смысла в объектах с делящимися и растягивающимися клетками (¹³). Поскольку исследованные семядоли резко различаются по количеству запасного белка, расчет активности на 1 мг белка гомогената не имеет преимуществ по сравнению с расчетом на единицу воздушно-сухого веса.

Использована глюкоза фирмы Полфа (ПНР); гексозофосфаты, триозофосфаты, НАД, НАД-Н, НАДФ, АДФ, АТФ фирмы «Реанал» (ВНР); трис-основание фирмы «Сигма» (США); имидазол фирмы «Флюка» (Швейцария); ЭДТА фирмы «Хемапол» (ЧССР); 2-меркаптоэтанол фирмы «Мерк» (ФРГ); восстановленный глутатион фирмы «Шухардт» (ФРГ); этанол, пируват и арсенат отечественного производства, ферментные препараты глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы фирмы «Флюка» (Швейцария); альдолаза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа и пируваткиназа фирмы «Реанал» (ВНР); лактатдегидрогеназа и смесь триозофосфатизомеразы и глицерин-3-фосфатдегидрогеназы фирмы «Берингер» (ФРГ).

Результаты представлены в виде рисунка, на котором по вертикали отложена величина активности ферментов в логарифмическом масштабе, что позволяет сравнивать ферменты, сильно различающиеся по активности. Этот способ, предложенный и широко используемый в работах школы Бюхера (¹⁴), является удобным для сравнительных целей, так как дает возможность количественного и наглядного сопоставления различных объектов.

В семядолях трех исследованных растений было обнаружено (рис. 1) близкое соотношение активностей ФГК, ФПГ и ГАФДГ, входящих в «константную группу» гликолитических ферментов. Если в разных типах мышц филогенетически отдаленных животных и в отдельных органах млекопитающих отношение ФГК/ФПГ составляло от 2 до 8 (^{6, 7}), то в исследованных семядолях — от 3 до 11. В отличие от тканей животных, где активность ГАФДГ приближалась к активности ФГК, в семядолях уровень ГАФДГ оказался гораздо ниже ФГК. Подобное соотношение ГАФДГ и ФГК отмечено и для проростков пшеницы (¹⁵) и, возможно, является характерной особенностью растительных тканей. Диапазон изменения активностей для трех ферментов константной группы гликолиза в расчете на 1 г веса в разных типах мышц животных был много шире, чем в семядолях. Так, активность ГАФДГ в гладкой мышце составляла 5% от активности в белой скелетной мышце (⁶), в то время как в семядолях трех растений крайние величины активности ГАФДГ различались не более чем в 3 раза.

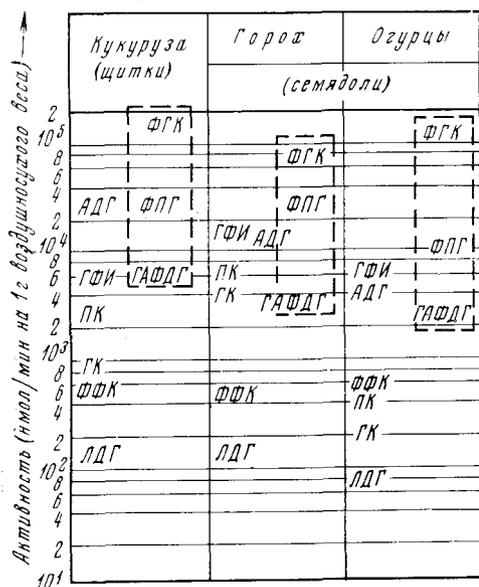


Рис. 1. Активность ферментов гликолиза в семядолях покоящихся семян. АДГ — алкогольдегидрогеназа, ГАФДГ — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, ГК — гексокиназа, ГФИ — гексозофосфатизомераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ПК — пируваткиназа, ФГК — фосфоглицераткиназа, ФПГ — фосфопируватгидратаза, ФФК — фосфофруктокиназа

Уровень двух ключевых ферментов гликолиза, катализирующих необратимые реакции ⁽¹⁶⁾, — гексокиназы (ГК) и пируваткиназы (ПК), менялся в более широких пределах: активность ГК в семядолях огурцов составляла 6%, а ПК 5% от активности у гороха, щитки кукурузы занимали промежуточное положение. Напротив, активность третьего ключевого фермента гликолиза, фосфофруктокиназы (ФФК), была почти одинаковой в тканях трех объектов. Известно, что активность самой медленной ключевой киназы может определять скорость всего гликолитического процесса ⁽¹⁷⁾. Тогда в семядолях гороха и щитках кукурузы такую регуляторную функцию, вероятно, выполняет ФФК, а в семядолях огурца — ГК. Соотношение активностей трех ключевых киназ различалось у исследованных типов семядолей. Так, отношение ПК/ФФК было наибольшим у гороха и наименьшим у огурца. Активность глюкозофосфатизомеразы (ГФИ), одного из ферментов, катализирующих обратимые реакции гликолиза ⁽¹⁶⁾, оказалась сравнимой у трех видов семядолей.

У всех трех растений присутствовали алкогольдегидрогеназа (АДГ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), функционирующие в период временного анаэробизма на ранних этапах прорастания многих видов семян ⁽²⁾. При этом активность АДГ оказалась гораздо выше, чем ЛДГ: в щитках отношение АДГ/ЛДГ составляло 220, в семядолях гороха 90, огурца 50. Хотя ЛДГ является ферментом с наименьшей активностью у трех типов семядолей, она катализирует боковую реакцию, представляющую собой ответвление от главной последовательности гликолитических реакций, и поэтому не может участвовать в регуляции скорости гликолитического процесса.

Итак, все девять исследованных ферментов гликолиза обнаруживаются в исследованных семядолях покоящихся семян. В семядолях растений, как и в клетках дрожжей и тканях насекомых или млекопитающих, присутствует «константная группа» гликолитических ферментов. Возможно, что в семядолях трех типов скорость гликолиза ограничивается разными ключевыми киназами — ГК или ФФК.

Исследование более широкого круга растений позволит, как мы надеемся, выявить и другие особенности ферментного аппарата клетки в таксономическом и филогенетическом плане.

Приношу глубокую благодарность члену-корреспонденту АН СССР Ф. Э. Реймерсу за постоянное внимание к работе.

Сибирский институт физиологии
и биохимии растений

Поступило
19 VII 1971

Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Г. Серебряков, Морфология вегетативных органов высших растений, М., 1952. ² А. М. Мауер, А. Poljakoff-Mauser, The Germination of Seeds, Oxford, 1963. ³ M. D. Hatch, J. F. Turner, Biochem. J., 69, 3, 495 (1958). ⁴ H. Bartels, Planta, 55, 3, 573 (1960). ⁵ E. Latzko, J. P. Kotz é, Naturwiss., 52, 5, 111 (1965). ⁶ D. Pette et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 6, 419 (1962). ⁷ D. Pette, Naturwiss., 52, 22, 597 (1965). ⁸ T. Bücher et al., Hoppe-Seyler/Tierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10 Aufl., 6A, Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1964. ⁹ A. P. Brown, J. L. Wray, Biochem. J., 108, 3, 437 (1968). ¹⁰ D. T. Dennis, T. B. Coultate, Biochim. et biophys. acta, 146, 1, 129 (1967). ¹¹ H. Miyata, Y. Yamamoto, Plant and Cell Physiol., 10, 4, 875 (1969). ¹² E. A. Cossins et al., Phytochemistry, 7, 7, 1115 (1968). ¹³ M. Г. Зайцева, Бот. журн., 36, 2, 288 (1951). ¹⁴ T. Bücher, M. Klingenberg, Angew. Chem., 70, 17/18, 552 (1958). ¹⁵ A. M. Firenzuoli et al., Plant Physiol., 43, 2, 260 (1968). ¹⁶ G. Weber, Naturwiss., 55, 9, 418 (1968). ¹⁷ Ч. Уолтер, Кинетика ферментативных реакций, М., 1969.