

А. М. ЩЕРБАКОВА

**ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, ЗАКАЛЕННОЙ
ТЕПЛОМ И ХОЛОДОМ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 15 XI 1971)

При действии супероптимальной температуры на целые растения или изолированные листья отмечается увеличение устойчивости растительных клеток к нагреву и ряду других агентов — тепловая закалка⁽¹⁾. Известно, что и холодовая закалка у многих растений наряду с повышением холодоустойчивости также вызывает повышение теплоустойчивости клеток⁽²⁻⁵⁾. Предполагается, что в основе реактивного повышения устойчивости растительных клеток к действию нагрева в результате закалывания теплом и холодом лежит стабилизация протоплазматических белков^(6, 7). Экспериментальные доказательства в пользу этого предположения для тепловой закалки были получены рядом авторов, показавших увеличение теплоустойчивости некоторых белков, выделенных из закаленных теплом листьев разных растений⁽⁸⁻¹¹⁾. Явление холодовой закалки в этом плане менее изучено, и результаты таких исследований неоднозначны. В работе⁽¹²⁾ показано увеличение устойчивости к нагреву диастазы в экстракте из корней люцерны в зимний период. Имеются также данные о повышении теплоустойчивости реакции ферментативного восстановления тетразолия в эпидермальных клетках листьев озимой пшеницы после тепловой и холодовой закалок⁽¹³⁾. Напротив, теплоустойчивость и температурный оптимум кислой фосфатазы из листьев озимой пшеницы не менялись при холодовой закалке в природе и в эксперименте⁽¹⁴⁾. Настоящая работа продолжает исследование теплоустойчивости белков, экстрагированных из закаленных теплом и холодом листьев, на примере глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (α -глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза, 1.1.1.49) — растворимого цитоплазматического фермента, связанного с пентозофосфатным циклом.

Проростки озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Рубин выращивали до фазы 1-го листа на водопроводной воде при температуре 21—22° и освещении 5000 лк. В опытах использовали закончившие рост семядольные листья.

Тепловую закалку целых проростков производили во влажной камере в течение трех часов при температуре 40—42°.

Холодовую закалку в искусственных условиях получали, закалывая 5-дневные проростки в холодильнике сначала 7 суток на свету при 2—5° и затем 4—8 суток в темноте при —1°⁽¹⁵⁾. В качестве контроля брали закончившие рост листья 10—14-дневных проростков, совпадающих по фазе развития с проростками из холодильника.

В зимние месяцы из-под снега выкапывали растения озимой пшеницы, высеянные в грунт в конце августа и получившие, таким образом, холодовую закалку в природных условиях.

При указанных выше условиях закалывания теплом и холодом теплоустойчивость движения протоплазмы в эпидермальных клетках листьев пшеницы увеличивалась в среднем на 1,5—2,0°^(13, 14).

Экстракцию и определение активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы осуществляли по методу, приведенному в работе Филнера и Клейна

(¹⁶). Измельченные листья (500 мг) растирали в 4 мл 0,05 *M* трис-НСl-буфера, рН 7,5, отжимали через капрон и центрифугировали 20 мин. при 20 000 *g*. Все эти операции производили при 4°. В надосадочной жидкости определяли активность фермента при комнатной температуре (22—24°). Состав инкубационной смеси был следующий: 0,1 мл 0,5 *M* трис-НСl-буфера, рН 7,5; 0,1 мл 0,1 *M* MgCl₂; 0,2 мл 0,003 *M* НАДФ; 0,1 мл 0,02 *M* глюкозо-6-фосфата натрия; 0,2 мл экстракта; 1,3 мл Н₂О. Реакцию начинали добавлением экстракта. Холостая проба содержала 0,2 мл экстракта

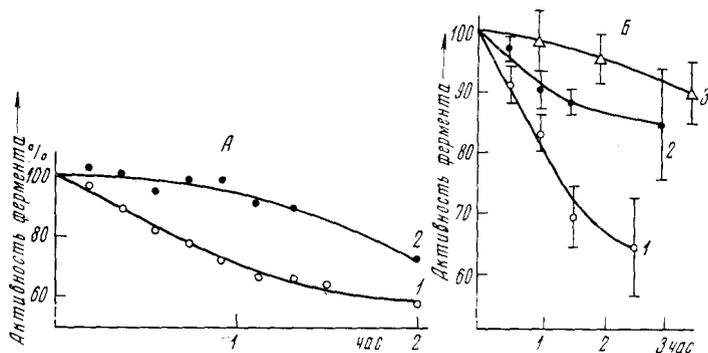


Рис. 1. Инактивация глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при 24° в экстракте: А — из незакаленных (1) и закаленных в течение 3 час. при 42° (2), Б — из незакаленных (1) и закаленных холодом (2 — в холодильнике, 3 — в природе) листьев пшеницы

та и 1,8 мл Н₂О. На СФ-4а измеряли увеличение оптической плотности при 340 мμ. Активность фермента выражали в μмолях восстановленного НАДФ в 1 мин. на 1 мг белка. Содержание белка в экстракте определяли по методу Лоури в модификации Матцельта и Гомана (¹⁷). Обычно в инкубационной смеси содержалось 150—250 мг белка.

Теплоустойчивость глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы оценивали по ее остаточной активности после 10-минутного прогрева экстракта при заданной температуре в интервале от 36 до 42°.

Вычисление границ доверительных интервалов средних арифметических проводили с помощью экспрессного метода, основанного на оценке размаха варьирования (¹⁸). На рис. 2 и 1Б каждая точка — среднее из 5—10 измерений.

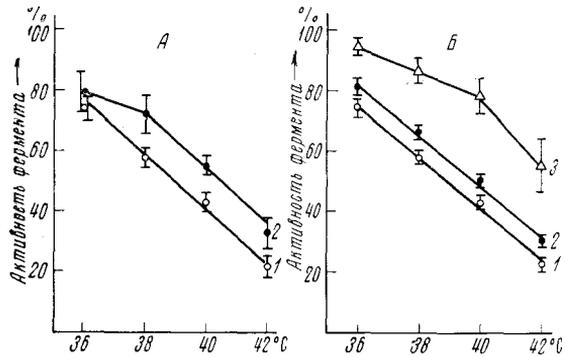
Удельная активность фермента в неочищенном экстракте из 10—14-дневных листьев сразу после выделения составляла $0,060 \pm 0,002$ μмоля восстановленного НАДФ в 1 мин. на 1 мг белка. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа очень быстро инактивируется при комнатной температуре. Поэтому действие нагрева оценивали, сравнивая активность фермента в прогретом экстракте с активностью фермента в непрогретой порции того же экстракта, находившейся в течение такого же времени при 24°. Значения активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в непрогретом экстракте в пущный момент времени не измерялись, а рассчитывались на основании кривой снижения исходной активности при 24°, которую строили для каждого отдельного опыта. Получение кривой теплоустойчивости фермента занимало, как правило, 40—50 мин. Поскольку за этот промежуток времени, начиная с момента получения экстракта, активность фермента падала прямолинейно (рис. 1А, 1), то для построения кривой снижения активности при 24° было достаточно измерить активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы сразу после выделения экстракта и в самом конце опыта.

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа в экстракте оказалась довольно термолabileм ферментом: 10-минутный прогрев экстракта при 39° подав-

лял ее активность на 50% (рис. 2А, 1). Разведочные опыты показали, что устойчивость этого фермента в клетке значительно выше: активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в экстракте из листьев, прогретых 30 мин. при 45°, не отличалась от активности фермента в экстракте из непрогретых листьев.

Тепловая закалка в течение 3 час. при 40° приводила к некоторому увеличению исходной удельной активности фермента (на 5—10%). Содержание белка в экстракте из листьев пшеницы после закали-

Рис. 2. Теплоустойчивость глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в экстракте: А — из незакаленных (1) и закаленных в течение 3 час. при 40° (2) листьев пшеницы; Б — в контроле (1) и после искусственной (2) и естественной (3) холодной закалики проростков пшеницы



вания не изменялось (11). В результате тепловой закалики теплоустойчивость глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы повышалась (рис. 2А, 2). Остаточная активность фермента (в процентах от исходной) после тестирующих 10-минутных прогревов экстракта из закаленных листьев при 38—42° была на 10—15% выше, чем в таком же образом прогревом экстракте из незакаленных листьев. Эта разница статистически достоверна.

Различие в устойчивости глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы до и после тепловой закалики 10—14-дневных проростков можно наблюдать не только прогревая экстракт при повреждающей температуре, но и сравнивая кривые инактивации фермента при 24° в контроле и после закаливания. На рис. 1А приведены данные одного из опытов, показывающих, что активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в экстракте из закаленных при 42° листьев за 1 час при 24° падает на 5%, тогда как в контроле за это же время фермент инактивируется на 30%.

Холодовая закалика проростков пшеницы вызывала по сравнению с тепловой закаликой более значительное повышение активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при расчете на единицу сырого веса: искусственная в 2 раза, естественная в 3—4 раза. Однако закаливание холодом приводило к увеличению содержания водорастворимого белка в единице сырого веса листьев пшеницы по сравнению с незакаленными листьями, находящимися в той же фазе развития (14). Поэтому при отнесении ферментативной активности на 1 мг белка в экстракте из закаленных холодом интактных листьев получали превышение удельной активности над уровнем контроля всего на 30—40%.

В результате закаливания холодом, так же как и при закаливании теплом, повышалась теплоустойчивость глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы: на 10% при закаливании в холодильнике и на 30% в природных условиях (рис. 2Б). Приведение концентрации белка в экстракте из закаленных холодом листьев к уровню контроля путем дополнительного разведения экстракта показало, что повышение количества белка после холодной закалики само по себе не влияло на ход кривой теплоустойчивости фермента.

Также очевидна разница в устойчивости фермента в экстракте из незакаленных и закаленных холодом листьев при сопоставлении кривых его инактивации при 24°: за два с половиной часа активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в контрольном экстракте в этой серии опытов па-

дает на 35%, а в экстракте из закаленных холодом листьев — лишь на 10—15% (рис. 1Б).

Приведенные результаты показывают, что не только тепловая, но и холодовая закалка проростков озимой пшеницы наряду с повышением теплоустойчивости клеток вызывают и повышение теплоустойчивости глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, экстрагированной из закаленных листьев. Результаты однозначны при использовании разных способов тестирования устойчивости фермента: по его остаточной активности после 10-минутного прогрева экстракта при повреждающей температуре и по скорости его инактивации при 24°. Таким образом, ранее полученные данные о повышении у закаленных теплом и холодом листьев озимой пшеницы теплоустойчивости внутриклеточных дегидрогеназ, ответственных за восстановление тетразолия, подтверждаются для одного из ферментов этой группы при испытании его теплоустойчивости в гомогенате.

Небольшая величина эффекта закаливания (10—15%), полученная для глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и регистрируемая на выделенном белке, заставляет предположить, что изменение теплоустойчивости ксил-фосфатазы при холодовой закалке озимой пшеницы, возможно, не удалось уловить по методическим причинам⁽¹⁴⁾.

О том, что является причиной повышения теплоустойчивости глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при тепловой и холодовой закалке, сказать пока трудно. Одним из подходов к решению этого вопроса может служить получение очищенного препарата данного фермента.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
8 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. Ya. Alexandrov, A. G. Lomagin, N. L. Feldman, *Protoplasma*, **69**, 417 (1970). ² В. Я. Александров, М. И. Лютова, Н. Л. Фельдман, *Цитология*, **1**, 672 (1959). ³ O. L. Lange, *Planta*, **56**, 666 (1961). ⁴ В. Я. Александров, Е. И. Денъко и др., В сборн. Цитологические основы приспособления растений к факторам среды, «Наука», 1964, стр. 103. ⁵ W. Schwarz, *Flora*, **159**, 258 (1970). ⁶ В. Я. Александров, Тр. Бот. инст. АН СССР, сер. 4, эксп. бот., **16**, 234 (1963). ⁷ V. Ya. Alexandrov, *Quart. Rev. Biol.*, **39**, 35 (1964). ⁸ E. J. Kinbacher, Ch. Y. Sullivan, H. R. Knull, *Crop Sci.*, **7**, 148 (1967). ⁹ Ch. Y. Sullivan, E. J. Kinbacher, *Crop Sci.*, **7**, 241 (1967). ¹⁰ N. L. Feldman, *Planta*, **78**, 213 (1968). ¹¹ А. М. Щербакова, ДАН, **199**, 727 (1971). ¹² H. M. Tysdal, *J. Agr. Res.*, **48**, 219 (1934). ¹³ А. М. Щербакова, *Цитология*, **11**, 1467 (1969). ¹⁴ А. М. Щербакова, *Цитология*, **13**, 484 (1971). ¹⁵ И. И. Туманов, *Физиологические основы зимостойкости культурных растений*, М.—Л., 1940. ¹⁶ B. Filner, A. O. Klein, *Plant Physiol.*, **43**, 1587 (1968). ¹⁷ D. Matzelt, J. Homann, *Biochem. Zs.*, **330**, 245 (1958). ¹⁸ И. П. Ашмарин, Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов, Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов, Л., 1971.