

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Т. И. КАРЯКИНА,
Л. И. СИДЕЛЬНИКОВА

РЕГУЛЯЦИЯ АММОНИЕМ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Ранее было показано, что инфильтрация солей аммония в корешки проростков гороха индуцирует в них синтез глютаматдегидрогеназы (ГДГ) ⁽¹⁾, активность которой учитывали по восстановительному аминированию α -кетоглutarовой кислоты. Одновременное введение в корни проростков NH_4^+ и актидиона предотвращало индукцию фермента. Аналогичные данные были получены в нашей лаборатории для корешков проростков кукурузы ⁽²⁾.

Установлено также ⁽³⁾, что при корневой подкормке проростков гороха солями аммония последние легко проникают в ткани растения,

Таблица 1

Содержание аммония в корешках и листочках проростков пшеницы (NH_3 в $\mu\text{г}$ на 1 г сырого веса)

Питательный раствор	Время экспозиции, сутки		
	2	4	6
Вода	33,9	40,4	33,2
	26,1	24,0	18,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	189,3	229,5	146,4
	36,6	51,3	73,7

Примечание. Числа над чертой — данные для корешков, под чертой — для листочков.

вызывая резкое увеличение активности ГДГ, учитываемой по восстановительному аминированию α -кетоглutarовой кислоты. Увеличение активности ГДГ происходило как в корешках, так и в листочках проростков. Данные электрофореза в полиакриламидном геле показали сильное увеличение полос активности ГДГ, соответствующих изоэнзимам ГДГ, как специфичным только к НАД, так и специфичным к НАД и НАДФ. Изоэнзим ГДГ, специфичный к НАД, присутствует как в корешках, так и в листочках проростков, а изоэнзим, специфичный к НАД и НАДФ, присутствует только в листочках и локализован в основном в хлоропластах ⁽⁴⁾.

Имея в виду высокую специфичность обмена веществ у растений, нам представлялось важным выяснить, оказывают ли ионы аммония влияние на ГДГ проростков злаков. С этой целью в качестве объекта исследования были взяты проростки пшеницы.

Проростки сорта «Немчиновка 495» выращивали на воде в течение 7—10 дней, затем после удаления эндоспермов часть проростков оставляли на дистиллированной воде, в другую часть пересаживали на раствор

$1,25 \times 10^{-2} M$ $(NH_4)_2HPO_4$. Материал отбирали в три приема: первую партию — через двое суток, вторую — через четверо суток и третью — через шесть суток. В течение выращивания проростков вода и раствор аммония менялись каждый день.

Ферментные экстракты выделяли как из корешков, так и из листочков по методике, описанной ранее ⁽⁴⁾. Электрофорез проводили при $+3^\circ$ и силе

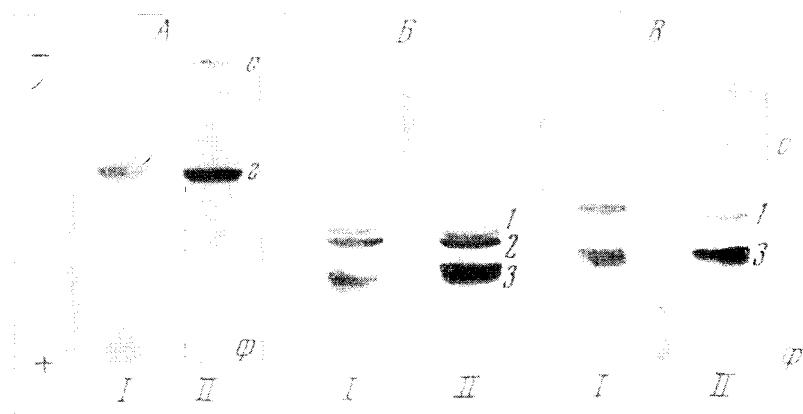


Рис. 1. Зимограмма ГДГ с НАД из корешков (А) и с НАД (Б) и с НАДФ (В) из листочков проростков пшеницы с удаленными эндоспермами после экспозиции в течение 2 суток (А) и шести суток (Б, В). I — на воде, II — на $(NH_4)_2HPO_4$; 1 — красноватая полоса, 2 и 3 — синие полосы; С — старт, Ф — фронт

тока 3 ма на колонку с использованием полпакриламидного геля по методу Девиса ⁽⁵⁾ и Орнштейна ⁽⁶⁾. Ферментный экстракт наносили на колонку по 0,3 мл перед самым электрофорезом. Расположение на колонке полос, соответствующих активности глутаматдегидрогеназы, определяли по образованию формазанов в присутствии глутамата, НАД или НАДФ.

Таблица 2

Влияние аммония на активность глутаматдегидрогеназы с НАД и НАДФ

Питательные растворы	Удельная активность			Общая активность, м.г. экстракта		
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	2 сут.	4 сут.	6 сут.
Корни						
Вода	<u>95,3</u>	<u>80,3</u>	<u>80,0</u>	<u>90,5</u>	<u>72,6</u>	<u>72,0</u>
$(NH_4)_2HPO_4$	<u>234,0</u>	<u>259,2</u>	<u>220,7</u>	<u>269,4</u>	<u>297,1</u>	<u>253,8</u>
Листья						
Вода	<u>75,0</u>	<u>67,7</u>	<u>30,6</u>	<u>150,0</u>	<u>135,4</u>	<u>61,2</u>
	<u>30,0</u>	<u>22,5</u>	<u>20,3</u>	<u>60,0</u>	<u>45,0</u>	<u>40,6</u>
$(NH_4)_2HPO_4$	<u>79,0</u>	<u>91,4</u>	<u>111,6</u>	<u>182,0</u>	<u>210,2</u>	<u>256,4</u>
	<u>39,2</u>	<u>71,2</u>	<u>70,5</u>	<u>90,1</u>	<u>163,8</u>	<u>162,2</u>

Примечание. Числа над чертой — данные для ГДГ — НАД, под чертой — для ГДГ — НАДФ. Время в экспозиции дано в сутках.

фенозинметосульфата и нитротетразолиевого синего ⁽⁷⁾. Спектрофотометрическое определение глутаматдегидрогеназы проводили в трис-НСI-буфере 0,05 M при pH 7,8 как описано ранее ⁽¹⁾. Определение свободного аммиака проводили в водных экстрактах по методу Любимова и др. ⁽⁸⁾. Белок определяли в ферментных экстрактах по Лоури после диализа.

Чтобы выяснить, имеется ли связь между концентрацией ионов аммония в тканях растения и активностью ГДГ, в корешках и листочках, из которых получали ферментные экстракты, определяли содержание аммония. Полученные при этом данные представлены в табл. 1.

Уровень свободного аммиака у проростков, оставленных на воде в течение шести суток, заметно снижается в листочках, а в корешках держится более или менее на одном уровне. Проростки, пересаженные на аммоний, активно его насыщают. Количество аммония в корешках резко возрастало на вторые сутки, достигало максимума на четвертые сутки и несколько снижалось на шестые сутки. В листочках происходило постепенное увеличение содержания аммония, и его количество достигало максимальной величины на шестые сутки.

Важно отметить, что активность ГДГ тесно связана с содержанием аммония в тканях растения. Так, в листочках проростков, голодающих по азоту, на шестые сутки активность ГДГ с НАД снизилась в два раза. Повышение содержания аммония при корневой подкормке приводит к резкому увеличению активности ГДГ сначала в корнях. Когда содержание аммония достигает определенного уровня в листочках, растение отвечает усиленным синтезом глутаматдегидрогеназы, что проявляется в увеличении активности ГДГ (табл. 2). Если изобразить графически активность ГДГ и содержание аммония в тканях корешков и листочков проростков пшеницы, голодающих и получающих подкормку аммонием, то будет ясно видно, что активность ГДГ следует за концентрацией ионов аммония. Таким образом, можно было думать, что ионы аммония оказывают индуцирующее действие на ГДГ. Это предположение подтверждается данными, полученными с помощью геле-электрофореза. При корневой подкормке аммонием в корешках уже на вторые сутки резко увеличивается полоса активности ГДГ с НАД (рис. 1А, полоса 2). В листочках идет постепенное увеличение полос активности ГДГ с НАД (рис. 1Б, полоса 2) и ГДГ, специфичной к НАД и к НАДФ (рис. 1В, полоса 3), достигая максимальной величины на шестые сутки. Эти данные еще раз указывают на то, что синтез и распад фермента ГДГ, специфичной как только к НАД, так и к НАД и НАДФ, тесно связан с содержанием ионов аммония в тканях растения. Повышение содержания ионов аммония в ткани растения приводит к усилению синтеза ГДГ.

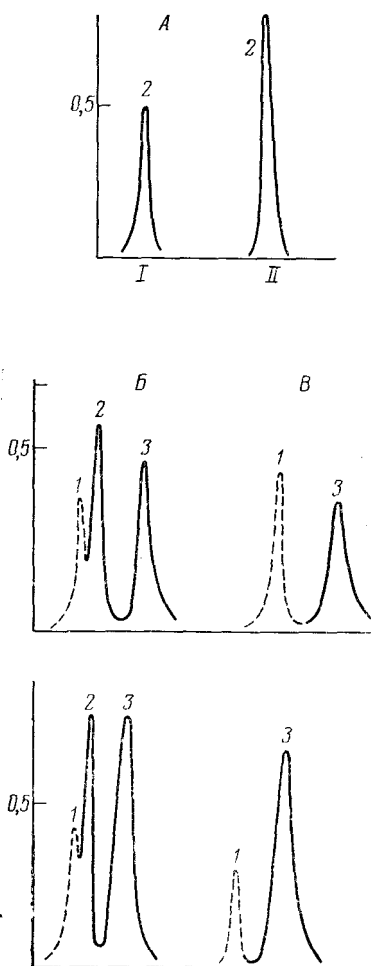


Рис. 2. Денситограммы полос, характеризующие активность ГДГ с НАД. Из корешков (А) с НАД (Б) и с НАДФ (В) из листочков проростков пшеницы. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Результаты, полученные ранее (¹⁻³), а также в данной работе, ясно показывают, что ионы аммония как у бобовых, так и у злаков играют роль фактора, регулирующего в ткани количество ГДГ — фермента, играющего ключевую роль в азотном обмене растений.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
3 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина, Г. Ш. Ткемаладзе, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 759 (1969). ² Т. А. Северная, Автореф. кандидатской диссертации, М., 1970. ³ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина и др., ДАН, **202**, № 1, 225 (1972). ⁴ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина и др., ДАН, **201**, № 5, 1252 (1971). ⁵ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, Part 2, 404 (1964). ⁶ L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, Part 2, 321 (1964). ⁷ D. A. Thurgman, C. Rabin, M. V. Lausock, Nature, **207**, 193 (1965). ⁸ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Б. Э. Кирштейне, Прикл. биохим. и микробиол., **4**, 120 (1968).