

УДК 581.1.032+577.15

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

В. Я. АЛЕКСЕЕВА, Л. Х. РАМАЗАНОВА

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ПЕРОКСИДАЗЫ ЛИСТЬЕВ БОБОВ В СВЯЗИ С ОБЕЗВОЖИВАНИЕМ

(Представлено академиком М. Х. Чайлахяном 31 VII 1972)

В настоящее время предполагается, что существование изозимов увеличивает адаптивные способности организмов при неблагоприятных воздействиях окружающей среды. В частности найдено, что изменение физиологического состояния растений по-разному отражается на изозимном спектре пероксидазы, важная роль которой в защитных реакциях растений показана рядом работ (¹⁻³). Литература о влиянии обезвоживания на активность пероксидазы немногочисленна и противоречива (^{4, 5}). Это объясняется, вероятно, прежде всего тем, что испытывалось действие обезвоживания различной степени. Вопрос о локализации пероксидазы и изменении изозимного спектра при обезвоживании не затрагивался.

В связи с изложенным выше целью нашей работы было выяснение влияния условий водоснабжения на активность и изоферментный спектр пероксидазы белков хлоропластов и цитоплазмы.

Объектом исследования служили листья бобов сорта Русские черные. Для анализа брались вполне сформировавшиеся листья второго яруса сверху. Опыт вегетационный. Частичное обезвоживание листьев создавали путем прекращения полива. Общее содержание воды в листьях в момент взятия пробы в контрольном варианте составляло 89,0%, в опытном — 80,1%. Хлоропласты изолировали методом дифференцированного центрифугирования в среде выделения следующего состава: 0,2 М трис-буфер, 0,005 М ЭДТА, 0,001 М MgCl₂, 0,25 М сахаразы в контрольном варианте, 0,5 М — в опытном. Молярность сахаразы взята с учетом сосущей силы листьев и хлоропластов. Буферные растворы брались в двойном объеме по отношению к навеске листьев. Растертую массу отжимали через полотно и центрифугировали при 500g для осаждения клеточных стенок и ядер. Надосаочную жидкость центрифугировали для осаждения хлоропластов при 2000g. Цитоплазму получали центрифугированием надосаочной жидкости при 30000g. Осадок хлоропластов дважды промывали путем последовательного суспендирования в среде выделения и осаждения центрифугированием. Хлоропласты разрушали осмотическим шоком и выделяли растворимые и труднорастворимые (структурные) белки хлоропластов (⁶). Все операции по выделению проводили на холоду. Пероксидазную активность белков цитоплазмы определяли методом А. Н. Бояркина с бензидином (⁷), а также спектрофотометрически с пирогаллолом и гваяколом (⁸). В структурных балках хлоропластов активность определяли с бензидином и пирогаллолом. Качественный состав белков исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (⁹). В каждую трубочку с гелем вносили выравненное по Лоури в модификации Потти (¹⁰) количество белка. Для выявления изоферментов пероксидазы использовали реакции с бензидином, гваяколом и пирогаллолом. Общее число белковых компонентов обнаруживали с помощью красителя кумасси ярко-голубого.

Результаты по распределению пероксидазной активности и влиянию обезвоживания представлены в табл. 1.

Изучение активности белков цитоплазмы и хлоропластов с типичными субстратами пероксидазного действия показало, что пероксидазная активность проявляется всеми исследованными белками. Обнаружено, однако, что в реакции с бензидином более активны белки хлоропластов, а с гваяколом — белки цитоплазмы (проявление субстратной специфичности пероксидазы, локализованной в различных частях клетки). С пирогаллолом уровень активности примерно одинаков для белков хлоропластов и цитоплазмы.

Таблица 1

Пероксидазная активность белков *

Субстраты	Цитоплазменные белки	Белки хлоропластов	
		растворимые	структурные
Бензидин, сек ⁻¹	0,303	0,854	2,42
	0,368	3,61	2,23
Гваякол, ΔE в 1 мин. на 1 мг белка	1,59	0,49	
	2,52	0,66	
Пирогаллол, ΔE в 1 мин. на 1 мг белка	2,74	3,68	2,80
	2,36	2,76	2,41

* Числа над чертой — полив, под чертой — засуха.

Под влиянием обезвоживания наблюдается повышение активности с бензидином у растворимых белков хлоропластов, незначительное — у цитоплазматических белков. Изменения активности структурных белков хлоропластов слабо выражены. В засуху у цитоплазматических и растворимых белков хлоропластов повышается активность с гваяколом. В реакции с пирогаллолом все изученные белки ведут себя одинаково: под влиянием обезвоживания активность пероксидазы снижается, т. е. направленность изменения активности с этим субстратом противоположна наблюдавшейся с бензидином и гваяколом.

Таким образом, определение пероксидазной активности с различными субстратами позволило выявить субстратную специфичность пероксидазы изученных белков, а также ее изменения под действием обезвоживания. Обезвоживание оказало влияние на субстратную специфичность цитоплазматических белков и растворимых белков хлоропластов. С целью выяснения возможных причин изменения активности и субстратной специфичности белков проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Результаты по электрофоретическому разделению белков в полиакриламидном геле представлены на рис. 1. Обнаружено 20 анодных (щелочной гель) компонентов в цитоплазматических белках, 13 — в растворимых, 7 — в структурных белках хлоропластов. При сравнении анодных изоферментных спектров белков можно видеть, что они различаются набором изоформ в зависимости от использованного субстрата. Наибольшее число изоферментов со всеми субстратами найдено в цитоплазматических белках, наименьшее — в труднорастворимых белках хлоропластов. С бензидином проявляет активность большее число белковых компонентов, чем с остальными субстратами. Выявленные изменения пероксидазной активности под влиянием обезвоживания проявляются в изотипном спектре, что выражается в изменении активности (ширине или интенсивности окрашивания полос субстратами), активации или инактивации отдельных белковых компонентов. Так, в цитоплазматических белках при обезвоживании компоненты с R_f 0,05; 0,25 окрашиваются бензидином интенсивнее, чем в поливе. В засуху обнаружена более высокая активность с гваяколом всех компонентов цитоплазматических белков. Пирогаллолом выявляется на один компонент меньше в засуху, что соответствует активности, обнаруженной в этих белках.

Обезвоживание оказало заметное влияние на активность и изотимный спектр растворимых белков хлоропластов. С бензидином активны два белковых компонента в контрольном варианте, три — в засуху. С пирогаллолом и гваяколом число изотимов при обезвоживании не меняется. С гваяколом наблюдается увеличение активности изоферментов в засуху, с пирогаллолом обнаруживается более высокая активность изоферментов поливного варианта. Обезвоживание не оказало заметного влияния на белковый спектр (крашение кумасси) и распределение компонентов между белками

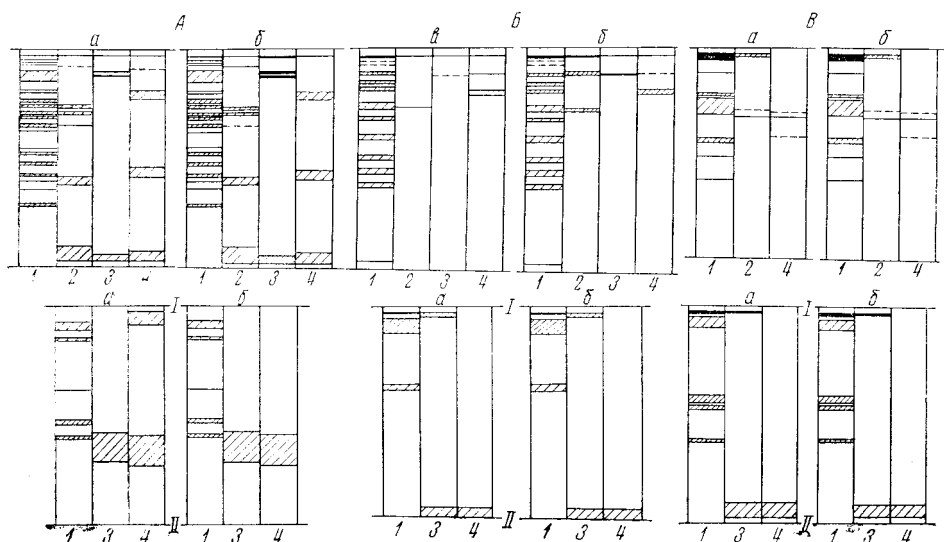


Рис. 1. Диаграммы электрофоретического разделения белков цитоплазмы (А), растворимых (Б) и структурных (Б) белков хлоропластов. I — анодные компоненты, II — катодные компоненты. а — контроль, б — засуха. Субстраты: I — кумасси, 2 — бензидин, 3 — гваякол, 4 — пирогаллол

цитоплазмы и хлоропластов. Что касается структурных белков хлоропластов, то никаких различий в изотимном спектре (с бензидином и пирогаллолом) между вариантами не найдено. Изоферментный спектр структурных белков хлоропластов более стабилен, чем растворимых белков и белков цитоплазмы.

Таким образом, изменение пероксидазной активности белков под влиянием обезвоживания является следствием изменений в активности и субстратной специфичности отдельных изотимов белкового спектра. И поскольку обезвоживание не оказало влияния на соотношение белковых компонентов спектра, можно предположить, по-видимому, что отмеченные изменения активности изотимов — следствие их качественных превращений.

Катодных компонентов значительно меньше у всех исследованных белков. С бензидином катодные компоненты активности не проявляли. Обезвоживание не оказало влияния ни на белковый, ни на изоферментный спектр при разгонке белков к катоду.

Полученные нами данные позволяют сделать предположение о приспособительном характере выявленных изменений в связи с установленным фактом увеличения доли пентозофосфатного пути дыхания на первом этапе обезвоживания у Русских бобов ⁽¹¹⁾, когда растения способны адаптироваться к действию неблагоприятного фактора. В свою очередь, как известно ⁽¹²⁾, с пентозофосфатным путем связана активация флавиновых оксидаз, с которыми пероксидаза составляет сопряженную систему ^(13, 14).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина, В. А. Аксенова, В кн. Функциональная биохимия клеточных структур, «Наука», 1970, стр. 349.
- ² Б. А. Рубин, Е. Н. Лушинская, Биохимия, **34**, в. 4, 674 (1969).
- ³ И. Г. Сулейманов, Л. Х. Рамазанова, В. Я. Алексеева, ДАН, **202**, в. 3, 748 (1972).
- ⁴ Н. С. Петин, К. М. Малышева, Физиол. раст., **7**, в. 5, 553 (1960).
- ⁵ Е. Л. Лукичева, В сборн. Физиологические процессы и продуктивность яровой пшеницы, Алма-Ата, 1968.
- ⁶ В. И. Сафонов, М. П. Сафонова, Физиол. раст., **16**, в. 1, 161 (1969).
- ⁷ А. Н. Бояркин, Биохимия, **16**, в. 4, 352 (1951).
- ⁸ J. J. Evans, N. A. Alldridge, Phytochemistry, **4**, 499 (1965).
- ⁹ В. И. Сафонов, М. П. Сафонова, Физиол. раст., **16**, в. 2, 350 (1969).
- ¹⁰ V. H. Potty, Anal. Biochem., **29**, 3, 535 (1969).
- ¹¹ Н. С. Петин, А. А. Арбаров, Физиол. раст., **13**, в. 3, 479 (1966).
- ¹² П. А. Колесников, С. В. Зорэ и др., Физиол. раст., **18**, в. 2, 275 (1971).
- ¹³ Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина, Энзимология и биология дыхания растений, М., 1966.
- ¹⁴ О. А. Семихатова, М., 1966.
- ¹⁵ О. А. Семихатова, Смена дыхательных систем, «Наука», 1969.