

Р. К. ШАДМАНОВ, П. Н. НИКОКИРИС

## ИЗОФЕРМЕНТЫ АМИЛАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ХЛОРОПЛАСТАХ ЛИСТЬЕВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ХЛОПЧАТНИКОВ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 20 I 1972)

Многочисленные данные указывают на то, что в тканях одного и того же вида, и даже в различных частях одной и той же клетки могут быть обнаружены ферменты, сходные по каталитическим функциям, но заметно различающиеся по своей молекулярной организации. Наиболее четко эти различия проявились при изучении их методами электрофореза на гелях (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Исследования, проведенные на уровне органов или тканей, показали, что во многих случаях выявляется определенная видовая специфичность в количестве зон и изоферментов, а также их электрофоретической подвижности (<sup>3</sup>). Это открывает широкие возможности для использования подобного показателя в целях биохимической систематики. Подобные исследования, связанные с систематикой растений, ведутся с целыми комплексами белков и нуклеотидного состава нуклеиновых кислот, за исключением работ по химической таксономии, связанных с веществами специфического обмена. Однако эти показатели характеризуют в основном крупные систематические единицы. При выяснении же внутривидовых (а также межвидовых в пределах рода) различий они менее эффективны. В этом отношении более приемлемыми оказались методы зимографии, высокая чувствительность которых позволила обнаружить тонкие генетические и онтогенетические изменения в наборе изоферментов (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>).

Большую ценность, на наш взгляд, представляет в этом плане изучение изоферментов, локализованных не в целом органе растения, а в отдельных структурных элементах клетки. В этом отношении наглядны исследования Курсанова и сотрудников, выявивших внутри клеток различных растений неодинаковый набор амилаз в цитоплазме и во фракции легкорастворимых белков хлоропластов (<sup>6</sup>). В противном случае, специфичное для вида распределение изоферментов может быть не обнаружено (<sup>7</sup>).

Кроме того, необходимо анализировать изоферментный спектр в одинаковую для всех исследуемых объектов фазу вегетации, поскольку имеются данные о том, что характер спектра зимограмм претерпевает значительные изменения в процессе развития (<sup>8-10</sup>).

Учитывая эти обстоятельства, мы провели исследование изоферментов амилазы и каталазы в хлоропластах листьев четырех видов хлопчатника в период бутонизации. Хлоропласты, как известно, локализуя в себе целый комплекс реакций, представляют собой удобный объект для изучения многих ферментов; в частности, основная доля активности каталазы, разлагающей перекиси, образующиеся при фотосинтетическом фосфорилировании, сосредоточена в хлоропластах (<sup>11</sup>). Амилазы также локализованы в пластидах, поскольку именно в них запасается крахмал, расщепляемый ими для поддержания равновесия в системе синтез — распад.

Исходным материалом служили четыре вида, относящиеся к роду *Gossypium*: *G. hirsutum* — сорт 108-ф, *G. barbadense* — сорт С-6022, *G. herbaceum* — сорт 2929, *G. arboreum* — сорт 3270. Объектом исследования служили хлоропласты, выделенные из листьев по методу (<sup>6</sup>) в нашей модификации. Срезанные листья из растений, выращиваемых в условиях

вегетационной площадки промывали холодной водой, измельчали и гомогенизировали в 3-кратном объеме среды, состоящей из 0,5M сахарозы, глутатиона (мг/мл) в 0,1M фосфатном буфере pH 8,5. Чистоту выделенных хлоропластов контролировали на люминесцентном микроскопе ЛМ-1. Все операции проводились на холоду. Выделенные хлоропласты разрушались добавлением неионного детергента тритон-X-100. После 15 мин. центрифугирования при 12 000 g получали белковую фракцию, которую исследовали электрофоретически на 7,5% полиакриламидном геле (<sup>12</sup>). Для гистохимического выявления изоферментного спектра амилазы и каталазы

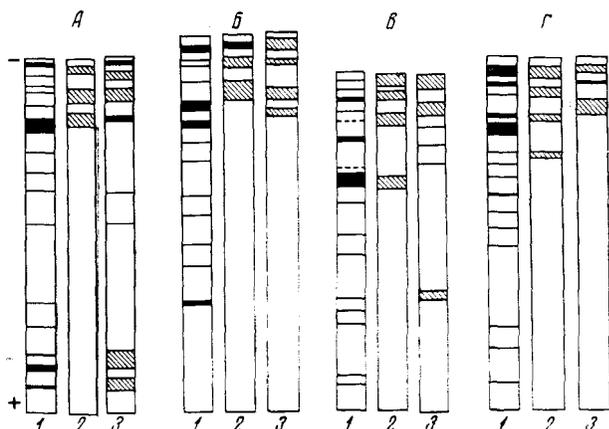


Рис. 1. Электрофореграмма суммарных белков (1) и зимограммы каталазы (2), амилазы (3) хлоропластов листьев *G. hirsutum*. (A) *G. barbadense* (B), *G. arboreum* (B), *G. herbaceum* (Г)

в состав геля вводили 1,0% раствор крахмала. Амилазная активность обнаруживалась инкубацией геля в течение 30 мин. в 0,1M растворе ацетатного буфера pH 5,6 при 37°. Окрашивание проводили 0,3% раствором иода в 3% KJ. В неокрашенных зонах геля присутствует амилазная активность. На рисунках они схематически изображены темными линиями. Амилазу не разделяли на составляющие ее  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазу, поэтому в работе мы отмечаем суммарную активность. Каталазная активность проявлялась 5-минутной инкубацией геля в 1% растворе перекиси водорода. Окрашивание геля проводили в 2% растворе KJ, подкисленном разбавленной уксусной кислотой.

Проведенные исследования позволили обнаружить значительную гетерогенность суммарных белков хлоропластов, довольно резко отличающуюся у разных видов (рис. 1). Подобные расхождения в спектре, если они обнаруживаются, могут также служить для выявления межвидовых различий. Однако все же к такому показателю следует подходить осторожно, так как при большом количестве зон может происходить наложение полос с близким  $R_f$  друг на друга, что при сравнительных исследованиях приводит к ошибочным выводам.

Анализ изоферментного спектра исследованных видов выявил качественную неоднородность амилаз и каталазы хлоропластов. Наиболее ярко это проявляется при сравнении амилаз. Число зон активности изоферментов варьирует от 3 до 8, в зависимости от вида. Характер расположения компонентов на зимограмме также указывает на явные межвидовые различия. Наибольшее число зон амилаз, в том числе зон с резко выраженной анодной подвижностью наблюдается в спектре у вида *G. hirsutum*. Подобная зона, но с несколько меньшей подвижностью обнаруживается и у вида *G. arboreum*. У остальных видов активность сосредоточена у катодного конца зимограммы.

Несколько иная картина в отношении интенсивности зон и их количества наблюдается в спектре каталазы. В частности, здесь отсутствуют компоненты, мигрирующие к аноду, что характерно в некоторых случаях для амилаз. Возможно, это объясняется большим молекулярным весом каталазы или же влиянием заряда металла, входящего в состав фермента. Кроме того, в данном случае обнаружилось значительное сходство в спектре у видов *G. hirsutum* с *G. barbadense* и у *G. arboreum* с *G. herbaceum*. Возможно, что здесь проявляется генетическая близость этих пар. Первые два вида — 52-хромосомные, вторые имеют в наборе 26 хромосом. Приведенные выше различия характеризуют только данную фиксированную фазу развития хлопчатников и указывают, вероятно, на неодинаковую степень активности метаболических процессов, связанную с этими ферментными системами.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изозимный спектр ферментов, выделенных из определенных частей клетки (хлоропласты) у растений одного возраста является довольно специфичным и может служить одним из показателей таксономической характеристики видов. Можно полагать, что подобная специфика есть отражение генетической разнокачественности, сложившейся в ходе эволюции и определяющей то динамическое равновесие обменных процессов, о которых мы можем косвенно судить, следя за изменениями изозимного состава ферментов в течение всего периода роста или вегетации.

Институт экспериментальной биологии растений  
Академии наук УзССР  
Ташкент

Поступило  
18 I 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. И. Яковлева. Усп. биол. хим., 9, 55 (1968). <sup>2</sup> Дж. Уилкинсон, Изоферменты, «Наука», 1968. <sup>3</sup> M. Dimitrescu, D. Carties, C. R., D272, 11, 1495 (1971). <sup>4</sup> K. T. Glasziou, J. C. Waldren, B. H. Most, Phytochem., 6, 769 (1967). <sup>5</sup> K. W. Joy, B. E. Folkes, J. Exp. Bot., 16, 646 (1965). <sup>6</sup> А. Л. Курсанов, В. И. Сафонов и др., В кн. Функциональная биохимия клеточных структур, «Наука», 1970, стр. 143. <sup>7</sup> R. Scogin, Phytochem., 8, 9, 1733 (1969). <sup>8</sup> Chen Shai-Lim, R. Towill Leslie, J. R. Lowenberg, Physiol. plant. 23, 3, 434 (1970). <sup>9</sup> Е. В. Будилова, Б. А. Рубин, Е. К. Антонова, ДАН, 198, № 3, 699 (1971). <sup>10</sup> Э. Е. Хавкин, Индуцированный синтез ферментов в процессах роста и морфогенеза растений, «Наука», 1969. <sup>11</sup> D. W. Krogmann, J. Biol. Chem., 235, 3630 (1960). <sup>12</sup> B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).