

УДК 575.173:577.158.44:633.15

ГЕНЕТИКА

Т. Б. СУХОРЖЕВСКАЯ, член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС,
Э. Е. ХАВКИН

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ НАД-СПЕЦИФИЧНОЙ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ (*ZEА МАYS* L.)

Изоферментные спектры глутаматдегидрогеназы (ГДГ) описаны у многих высших растений (¹⁻⁷), однако четкого представления о генетическом контроле изоферментов ГДГ пока нет. Это побудило нас изучить полиморфизм изоферментных спектров ГДГ, органоспецифические особенности спектров и их изменения в онтогенезе на удобном для генетического анализа объекте — у инбредных линий кукурузы.

Мы исследовали щитки, корни, листья 20 линий кукурузы и гибридов, полученных от скрещивания этих линий. Семена были получены на стационаре Института цитологии и генетики СО АН СССР в районе Адлера и на базе Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства летом 1974 г. Семена проращивали в течение 3 дней в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в темноте при 27°. Проростки делили на две группы: одну часть использовали для анализов, а другую переносили в водную культуру на среду Кнопа и выращивали еще 6 дней в камере с ксеноновыми лампами (освещенность 22 000 лк) с 16-часовым световым периодом при 25–30°.

Пробы растительного материала растирали в ступке с 4-кратным (в случае щитков и корней) или равным (в случае листьев) объемом 0,05 *M* трис-HCl-буфера, pH 8,3, содержащего 0,01 *M* 2-меркаптоэтанол. К гомогенату добавляли 2-кратный объем линейного полимера акриламида и центрифугировали при 18 000 *g* в течение 20 мин. Надосадочную жидкость подвергали диск-электрофорезу в 7,0% полиакриламидном геле при 4°. Часть опытов проводили на гелях разной пористости. Гели инкубировали при 37° в течение 15–20 мин. в смеси, содержащей 0,1 *M* глутамат, 0,5 мг/мл тетранитротетразолиевого синего, 0,15 мг/мл феназинметасульфата, 0,5 мг/мл НАД в 0,01 *M* фосфатном буфере, pH 8,8. Контролем служили гели, инкубируемые в смеси без субстрата или без кофермента.

На зимограммах щитка ниже спектра ГДГ, независимо от присутствия глутамата, постоянно выявлялась зона формаза, которая, как показали специальные опыты, соответствовала алкогольдегидрогеназе (АДГ). Окрашивание АДГ в щитках кукурузы, по-видимому за счет примеси этанола в реактивах, отмечено также Лонго и Скандалиосом (⁸). Генетическая изменчивость по АДГ изучена в нашей лаборатории ранее (⁹), поэтому применение АДГ в качестве внутреннего маркера (¹⁰) позволило повысить разрешающую способность метода. На зимограммах корней и листьев АДГ не окрашивалась из-за низкой активности фермента, поэтому для установления величины относительной подвижности (R_m) в этом случае мы использовали смеси (1 : 1) с экстрактом щитков.

Исследованные нами генотипы, за исключением линии С103, обладали семиполосным спектром ГДГ (рис. 1). В потомстве от самоопыления растений инбредных линий кукурузы не наблюдалось расщепления по числу полос в спектре. Это говорит о гомозиготности линий по генам, контролирующим спектр ГДГ. В то же время в спектрах разных линий мы обнаружили

некоторые изменения по числу и интенсивности полос. Одни линии имеют полный набор изоферментов ($W155,94 A286$), у других некоторые отсутствуют (пятый — у $W8A$ или второй — у $B14$), у третьих изменяется величина R_m для изофермента 1 (рис. 1). Этот полиморфизм любопытно сопоставить с данными Ли⁽⁵⁾, который наблюдал у 40 индивидуальных генотипов клеверины однотипный семиполосный спектр ГДГ. Характерные различия в интенсивности окрашивания преимущественно у быстро- и медленномигрирующих полос могут быть обусловлены разной ферментативной активностью изоферментов ГДГ или их концентрацией у разных генотипов. Во всяком случае, эта закономерность не связана с изменчивостью, вызванной условиями выращивания, поскольку в различающихся климатических условиях Адлера и Краснодара каждая линия имела один и тот же спектр ГДГ.

У гибридов, полученных от скрещивания линий, различающихся по интенсивности окрашивания быстрых и медленных изоформ, наблюдается аддитивное наследование интенсивности каждой изоформы, причем спектры реципрокных гибридов идентичны. Это говорит о ядерном контроле синтеза фермента (рис. 2а). Однако в спектрах реципрокных гибридов линии $S103$ с любой другой, обладающей 7 полосами ферментативной активности ГДГ, наблюдается явное влияние материнского генотипа, причем линия $S103$ каким-то образом может подавлять проявление семиполосного спектра у гибрида (рис. 2б).

При изучении органоспецифических особенностей спектра ГДГ в щитках и листьях у проростков линий, кроме $S103$, выявлен семиполосный спектр, в котором изофермент 1 отличается по интенсивности окрашивания. Корень обладает несколько отличным от щитка и листа набором изоферментов: выпадает часть изоферментов и становится более интенсивной окраска медленномигрирующей формы 7 (рис. 3). У $S103$ также наблюдаются органоспецифические различия по интенсивности окрашивания изоферментов (рис. 3). Различия в интенсивности окрашивания полос ГДГ в разных органах находили и другие авторы^(2, 5, 7). В противоположность наблюдениям Палиха и Хартманна^(3, 4, 7), в процессе развития в щитках и листьях кукурузы спектры ГДГ остаются постоянными для данного генотипа. Лишь в корне у линий с семиполосным спектром ГДГ на более поздних стадиях развития появляется изофермент 4 (рис. 3).

Для выявления возможных различий по молекулярному весу между разными изоформами ГДГ мы проводили электрофорез в гелях неодинаковой пористости и получили параллельные прямые зависимости $\lg R_m$ от концентрации геля для 7 полос ГДГ щитка. Это означает⁽¹¹⁾, что изоферменты ГДГ делятся по заряду, а величина молекулярного веса у всех изоферментов идентична. Сходные данные получены для корней и побегов гороха Палихом⁽⁷⁾. Он предположил, что образование семиполосного спектра ГДГ обусловлено случайной ассоциацией двух различных типов субъединиц в активную гексамерную молекулу. Альтернативную гипотезу предлагает Прайор⁽⁶⁾, который обнаружил по одному изоферменту ГДГ у инбредных линий кукурузы и считает, что фермент контролируется одним геном с тремя аллелями. Однако он не исключает возможности того, что ГДГ является гексамером (модель 3), поскольку единственную размытую полосу фермента у гибридных форм ему удавалось затем разделить хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе на 8 фракций, незначительно различающихся по электрофоретической подвижности.

Однако гипотеза Палиха — Прайора не может объяснить установленных нами фактов. Во-первых, наблюдаются различия в интенсивности окрашивания полос у разных генотипов с максимумом одновременно у наиболее быстрых^(1, 2) и наиболее медленных^(6, 7) изоформ, что сильно отличается от предсказываемого биномиального распределения с максимумом окрашивания у 4-й полосы. Во-вторых, гипотезе противоречит двухполосный спектр линии $S103$, единственного исключения в обследованной

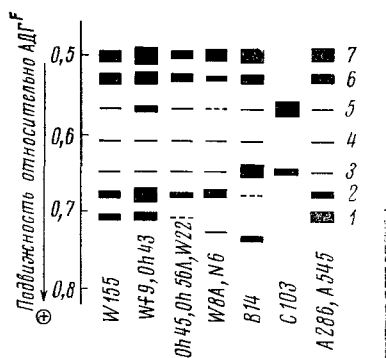


Рис. 1

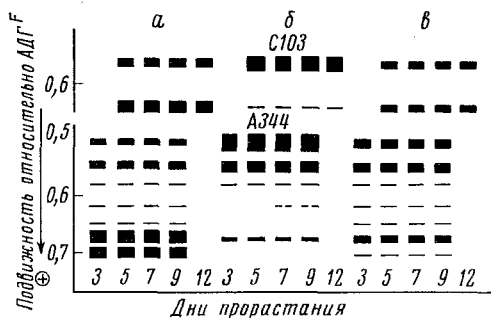


Рис. 3

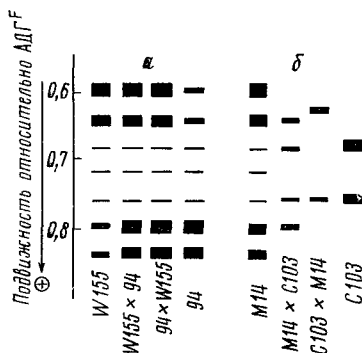


Рис. 2

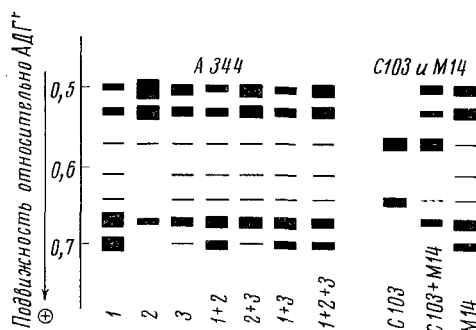


Рис. 4

Рис. 1. Изоферментные спектры ГДГ у линий кукурузы

Рис. 2. Особенности наследования изоферментов ГДГ у разных гибридов кукурузы (использовался 6,5% полиакриламидный гель). а, б — см. в тексте

Рис. 3. Изменения в спектрах ГДГ во время прорастания семян. а — щиток, б — корень, в — лист

Рис. 4. Опыты по смешиванию экстрактов (подробности в тексте). 1 — щиток, 2 — корень, 3 — лист

коллекции (рис. 1). В-третьих, на основе этой гипотезы нельзя интерпретировать ни спектры гибридов линии C103 (рис. 2б), ни четырехполосный спектр ГДГ в корнях (рис. 3).

Учитывая изложенные выше противоречия, данные (¹⁻⁷) и результаты наших опытов можно попытаться интерпретировать на основе двух рабочих гипотез. Первая из них — о гексамерном комплексе, состоящем из двух типов субъединиц в различных соотношениях, которые, возможно, определяются активностью двух генов, — уже обсуждалась Палихом (¹). Эта гипотеза приемлема, но без дополнительных допущений не объясняет картины распределения полос по интенсивности в спектрах ГДГ. Рассмотрим вторую гипотезу. Она заключается в том, что регуляция может осуществляться на уровне синтеза двух типов полипептидов, а затем на уровне их сборки в активную гексамерную молекулу фермента, благодаря присоединению какого-то фактора, обуславливающего упорядоченную ассоциацию. Если свойства фактора ассоциации наследуются, эта гипотеза включает модель 1 Прайора (⁶). В этом случае генетический контроль ГДГ может осуществляться двумя неаллельными структурными локусами и третьим локусом, ответственным за фактор ассоциации.

Существование устойчивых множественных форм ГДГ, казалось бы, доказывает генетическую детерминацию такой сборки, однако изменение

спектра фермента после его очистки (¹²) или после воздействия денатурирующих агентов (⁷) не позволяет исключить возможность последующих конформационных перестроек, связанных либо с потерей фактора ассоциации, либо с его действием *in vitro*. Впрочем, по данным, Хартманна (личное сообщение), семиполосный спектр сохраняется и после очистки ГДГ в 1000 раз, что ставит под сомнение результаты опытов (⁷, ¹²). Некоторое представление о свойствах гипотетического фактора ассоциации могут, вероятно, дать опыты по смешиванию экстрактов материала от разных линий или из разных органов проростка. Если фактор ассоциации прочно связан с гексамерами, спектр смешанной пробы будет строго аддитивным. Это предположение оправдывается, когда мы смешиваем экстракты щитка, корня и листа (рис. 4). Однако при смешивании экстрактов щитков линии С103 и М14 (1 : 1) какой-то фактор из С103 вызывает перераспределение по активности и подавляет проявление некоторых изоформ у М14 (рис. 4).

Свойства глутаматдегидрогеназы линии С103 заслуживают специального изучения, однако и анализ обычных семиполосных спектров не позволяет пока принять или окончательно отвергнуть одну из обсуждаемых гипотез о механизме формирования изоформ ГДГ.

Авторы признательны В. С. Щербаку и Е. В. Левитесу за любезно предоставленный линейный материал, а С. И. Малецкому и Л. И. Корочкину — за полезную дискуссию.

Сибирский институт физиологии и
биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
8 I 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. B. Yue, Plant Physiol., v. 44, 453 (1969). ² D. A. Thurman et al., Nature, v. 207, 193 (1965). ³ T. Hartmann et al., Planta, v. 111, 119 (1973). ⁴ T. Hartmann. Planta, v. 111, 129 (1973). ⁵ D. W. Lee, Phytochemistry, v. 12, 2631 (1973). ⁶ A. J. Pryor, Heredity, v. 32, 397 (1974). ⁷ E. Pählich, Planta, v. 104, 21 (1972). ⁸ G. Longo, J. G. Scandalios, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 62, 104 (1969). ⁹ E. B. Lesutec и др., ДАН, т. 218, 466 (1974). ¹⁰ J. B. Johnson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 997 (1971). ¹¹ J. L. Hedrick, A. J. Smith, Arch. Biochem. and Biophys., v. 126, 155 (1968). ¹² A. Errel et al., Plant and Cell Physiol., v. 14, 39 (1973).