

Рис. 1. Активность малатдегидрогеназы в органах сеянцев лиственницы сибирской в зависимости от периода затопления: 1 - контроль; 2 - опыт.

(К.Ф.2.7.1.40), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), (К.Ф.1.1.1.49), пероксидазы (ПО) (1.11.1.7), ИУК-оксидазы (ИУКО).

Объектом исследования служили сеянцы лиственницы сибирской, выращенные в обычном вегетационном опыте. В опытных сосудах корни 15-дневных проростков были полностью затоплены на протяжении всего опыта. В качестве контрольных использовали растения, выросшие при 60-70%-й влажности от полной влагоемкости почвы. Опыт проводился в условиях естественного освещения. Активность ферментов определяли спектрофотометрически в соответствующих буферных экстрактах тканей, предварительно очищенных методом гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-50. Основой для изучения активностей АДГ, ПК, ЛДГ, Г6ФДГ послужили приспособленные для работы с растительными тканями методы [9]. Активность МДГ определяли по [10], активность гваякол-специфичной пероксидазы - модифицированным методом по [31], активность ИУКО - по [12]. Концентрацию спирта в экстрактах тканей устанавливали энзиматическим методом с использованием кристаллической АДГ фирмы Merck [9]. Содержание белка в очищенных экстрактах тканей определяли по [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании особенностей превращения дыхательного материала в органах сеянцев лиственницы в условиях затопления их корней была изучена активность ключевых ферментов основных путей дыхания - аэробного, анаэробного и пентозофосфатного.

Разные пути дыхания отличаются друг от друга по количеству освобождаемой при окислении глюкозы энергии. Наиболее эффективным с энергетической точки зрения является окислительное фосфорилирование конечного продукта

гликолиза - пирувата в цикле Кребса. При затоплении корней сеянцев лиственницы во всех органах опытных растений отмечено изменение активности МДГ - фермента, катализирующего заключительную стадию цикла трикарбоновых кислот. После 10-дневного затопления активность МДГ в корнях была выше по сравнению с контролем в 2.2 раза, в стволиках на 15% и в хвое в 3.1 раза (рис. 1). По мере увеличения периода затопления активность фермента в корнях и стволиках сеянцев закономерно снижалась, в то время как в хвое к концу эксперимента возрастала в 4.1 раза. Значительный всплеск активности МДГ (в 11.7 раза по сравнению с контролем) в те же сроки обнаружен и в затопленных корнях сеянцев сосны обыкновенной [3], но в отличие от лиственницы надземные органы и, в особенности, хвоя сеянцев сосны на протяжении всего равноценно по длительности опыта проявляли очень низкую активность фермента по сравнению с контрольными растениями.

Одним из способов адаптации растений к анаэробному стрессу является переключение окислительного метаболизма углеводов на анаэробное дыхание. Показателем, определяющим интенсивность протекания гликолиза, служит активность АДГ - фермента, катализирующего образование этанола после перехода гликолиза в брожение. В литературе встречаются многочисленные данные о том, что в тканях как травянистых, так и древесных растений, испытывающих корневой анаэробизм, в большинстве случаев активность АДГ может возрастать даже у видов, обитающих в естественных переувлажненных местообитаниях [14, 15].

В корнях сеянцев лиственницы через 10 дней действия корневого анаэробизма активность АДГ была выше по сравнению с контролем в 6.3 раза, в стволиках на 19%, а в хвое практически не отличалась от контроля. По мере удлинения периода затопления активность фермента в стволиках и хвое опытных растений закономерно снижалась, в то время как в корнях она была в 2.2-2.6 раза выше, чем в контроле (рис. 2). Высокая скорость реакции восстановления ацетальдегида, катализируемой АДГ, приводит к образованию повышенного количества этанола в корнях и стволиках растений, испытывающих гипоксический стресс (табл. 1).

Повышенное содержание этанола при затоплении наблюдается в корнях и стволах многих древесных видов. Так, помещенные в неаэрируемую водную культуру сеянцы сосны скрученной и ели ситхинской немедленно реагировали на анаэробизм увеличением содержания спирта в корнях [19]. У затопленных сеянцев псевдотсуги Мензиеза корни также очень быстро начали синтезировать этанол, при этом его концентрация в

корнях и стволиках была в 6-16 раз больше, чем в хвоинках [22]. Значительное количество этанола было обнаружено в тканях семян сосны желтой, сосны скрученной, сосны Ламберта и пихты миловидной уже после 24 ч пребывания в бескислородной среде [23].

Многие исследователи считают, что накопление спирта в тканях растений при анаэробии характерно для неустойчивых растений, поскольку в больших концентрациях он является токсичным продуктом и может приводить к повреждению тканей или даже гибели растений. Другие, напротив, отмечают, что устойчивые растения способны накапливать большие количества продуктов брожения, активируя при этом определенные ферментативные системы, позволяющие оптимизировать дыхательные и обменные процессы [16, 18]. Освобождаясь от избытка спирта, растение частично выделяет его в наружную среду, причем особенно интенсивно это происходит в корнях [22]. Наряду с диффузией этанола устойчивые растения способны включать под действием стресса регуляторные механизмы, обеспечивающие его метаболизацию.

Было показано, что спирт может окисляться АДГ, каталазой и НАДФ-Н зависимой оксидазой до ацетоальдегида [6]. Кроме того, устойчивые к недостатку кислорода виды способны переключать метаболизм от этанола к яблочной кислоте [26] и осуществлять ряд реакций, приводящих к усиленному синтезу других органических кислот [32]. Таким образом, этиловый спирт не является пассивным продуктом гликолиза, а активно включается в систему гипоксического обмена растительной клетки [8].

На возможность вторичной переработки спирта растениями, испытывающими анаэробия, указывает Т.В.Чиркова [13], поскольку в корнях устойчивого к затоплению риса усиливалась активность АДГ, связанная не с восстановлением ацетоальдегида, а с окислением этанола. При этом значительная часть его может превращаться в другой продукт брожения - лактат. Накопление лактата, происходящее на первых стадиях анаэробии и вызывающее подкисление внутриклеточной среды, служит сигналом для включения пируватдекарбоксилазы (ПДК), оптимум активности которой связан с низкими значениями рН. Активирование ПДК приводит к конкуренции за пируват между АДГ и ПДК. При декарбоксилировании пирувата ПДК образуется ацетоальдегид, который при участии АДГ восстанавливается до этанола. В литературе также встречаются сообщения о том, что при анаэробии в тканях растений возможно одновременное накопление этанола и лактата.

В корнях семян лиственницы после 14-дневного затопления активность АДГ, катализирующую

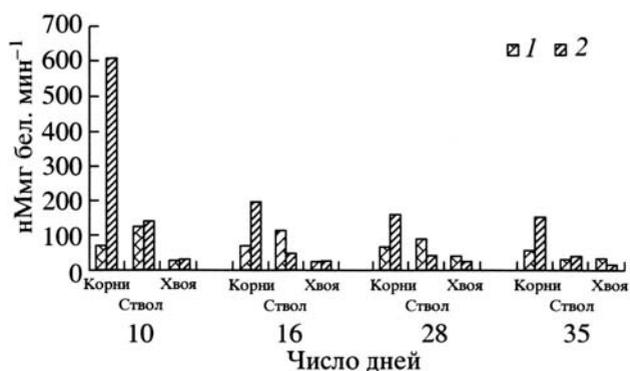


Рис. 2. Изменения активности алкогольдегидрогеназы в органах семян лиственницы в зависимости от продолжительности затопления их корней: 1 - контроль; 2 - опыт.

шей восстановление приувата, составила всего 77.8% от контроля, в то время как в стволиках она была выше на 75.4% и в хвое на 29.7%, чем у растений, растущих при нормальной влажности почвы. В этот же период удельная активность АДГ в корнях опытных семян была в 2 раза ниже по сравнению с активностью АДГ, реакция которой направлена в сторону образования спирта, так как скорость обратной реакции - окисления этанола в опыте как с сеянцами сосны, так и лиственницы, настолько мала, что зачастую не удается ее проследить.

Автор [6] считает, что у растений, неустойчивых к гипоксии, несбалансированное накопление этанола обусловлено отсутствием генетически закрепленной способности контролировать направленность процессов, вследствие чего нарушается система регуляции и становятся невозможными адаптивные реакции.

Последним этапом гликолиза является перенос высокоэнергетической фосфатной группы от фосфоенолпирувата на АДФ. Эту реакцию, практически необратимую в условиях клетки, катализирует пируваткиназа. Пируваткиназная активность является одним из двух главных регулирующих

Таблица 1. Содержание этанола в органах семян лиственницы в условиях затопления, мкМ г⁻¹ сухого вещества

Период затопления, дни	Орган	Контроль	Опыт	% от контроля
12	Корни	1.2 ± 0.18	2.1 ± 0.14	175.0
	Ствол	0.6 ± 0.03	1.2 ± 0.09	200.0
	Хвоя	1.3 ± 0.11	1.4 ± 0.12	107.0
35	Корни	2.5 ± 0.13	6.1 ± 0.17	244.0
	Ствол	0.9 ± 0.05	2.6 ± 0.21	288.8
	Хвоя	1.7 ± 0.12	1.9 ± 0.14	111.8

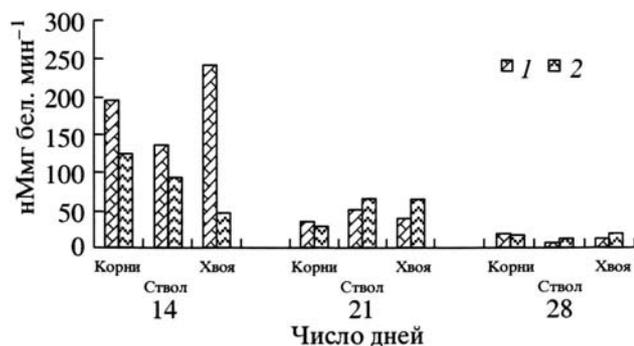


Рис. 3. Активность пируваткиназы в органах семян лиственницы при корневом анаэробии: 1 - контроль; 2 - опыт.

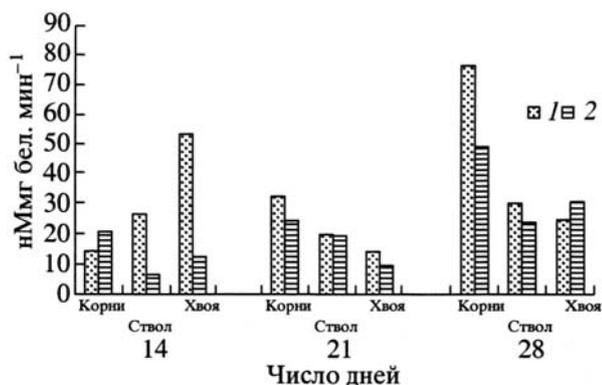


Рис. 4. Изменения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы под влиянием корневого анаэробии: 1 - контроль; 2 - опыт.

ных этапов гликолиза, поскольку последний в зависимости от условий ингибируется за счет либо фосфофруктокиназы, либо пируваткиназы. При низких концентрациях АТФ кажущееся сходство пируваткиназы к фосфоенолпирувату возрастает, и это позволяет ферменту перенести фосфатные группы от фосфоенолпирувата на АДФ даже при относительно низкой концентрации фосфоенолпирувата [11].

В настоящем опыте активность ПК в органах затопленных растений в первые 14 дней была значительно ниже, чем у контрольных (рис. 3). С удлинением срока затопления активность фермента снижалась как в опыте, так и в контроле, но при этом в надземных органах опытных семян лиственницы ПК была активнее по сравнению с растущими в условиях нормальной аэрации корней. Активацию ПК при гипоксии наблюдали в листьях гороха [2]. По-видимому, перераспределение активности по органам растений не только ПК, но и других исследованных ферментов является одним из показателей адаптации растений к гипоксическому стрессу, в результате чего осуществляется функциональная нагрузка как под-

земных, так и наземных органов в процессе приспособления.

Важное значение в дыхании растений имеет пентозофосфатный путь катаболизма глюкозы. Известно, что при недостатке или временном отсутствии кислорода возможна активация либо поддержание на высоком уровне ПФП дыхания. В условиях нормальной аэрации или при локальном анаэробии процессы гликолиза и ПФП осуществляются одновременно из-за их тесной взаимосвязи. При этом, как правило, сохранение высокого уровня апотомического дыхания при кислородном голодании возможно лишь короткое время, после чего активность ПФП снижается вплоть до потери способности к ее восстановлению. Увеличение доли ПФП в общем дыхании растений исследователи рассматривают как одну из возможностей усиления дыхательного процесса в целом [6]. Интенсивность пентозофосфатного пути дыхания определяется активностью его ключевого фермента - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

В настоящем опыте активность Г6ФДГ в корнях семян лиственницы после 14 дней затопления была выше, чем у растений, растущих при нормальной влажности почвы на 46.1%, а в стволиках и хвое составила соответственно лишь 23.9% и 23.0% от контроля (рис. 4). С нарастанием периода действия корневого анаэробии активность фермента в корнях и стволиках закономерно снижалась и к концу эксперимента (30 дней) активность Г6ФДГ в корнях была 63.9%, в стволиках - 81.0% от контроля, а в хвое возросла на 24.4%. В эти же сроки, как отмечалось, в корнях затопленных семян лиственницы, напротив, достаточно высока активность АДГ. Исходя из полученных данных, можно предположить, что продолжительное затопление семян лиственницы вызывает изменения дыхательного обмена в направлении усиления гликолиза с последующим образованием этанола и ослаблением как аэробного, так и апотомического способов дыхания. Существует представление о том, что работа ПФП при пониженном содержании кислорода может совершаться при наличии окислителя для образующегося в ходе его реакций НАДФН. Одной из возможностей регенерации НАДФН может быть деятельность пероксидазы, поскольку растительные пероксидазы помимо разложения перекисей, которые являются внутренним источником кислорода, способны непосредственно окислять НАДФН [6, 13].

Отмечено, что при кислородном голодании у растений усиливается активность пероксидазы, которая рассматривается как приспособительный фермент, так как при анаэробии у пероксидазы образуется дополнительный набор изоферментов, различающихся субстратной специфич-

ностью. Так, у пероксидазы, выделенной из колеоптилей овса, было идентифицировано несколько изоферментов с разной специфичностью к бензидину и гваяколу [21].

В опыте с затоплением корней сеянцев сосны обыкновенной также было показано, что характер изменений активности фермента в условиях недостаточного снабжения корней кислородом обусловлен его субстратной специфичностью и зачастую имеет компенсаторные свойства, позволяющие полнее использовать внутренние кислородные ресурсы клетки [3].

Высокая активность пероксидазы обнаружена в корнях и надземной части деревьев сосны обыкновенной, растущей на верховом болоте, максимальный уровень которой приходится на июнь-июль, когда корни растений испытывают острый дефицит кислорода из-за высокого стояния почвенных вод. В тканях корней затопленных деревьев пероксидаза активнее в десятки раз, чем у суходольных, в ксилеме ствола - в 10-17 раз и во флоэме - в 2-3 раза [4].

В настоящем эксперименте по мере удлинения срока затопления активность гваякол-специфичной пероксидазы в корнях сеянцев лиственницы закономерно возрастала, а в надземных органах, напротив, снижалась (табл. 2).

Широко известен тот факт, что помимо оксидазной функции в процессах биологического окисления, пероксидаза играет активную роль в общем метаболизме растительной клетки: данными многих авторов установлена ее связь с метаболизмом ИУК, нитратов и процессами лигнификации.

Пероксидазе принадлежит важнейшая роль в процессе окисления индолилуксусной кислоты, поскольку она является частью ауксиноксидазной ферментной системы. Пероксидаза, аэробно окисляя ИУК до соединений, не содержащих индольной группы, способна тем самым регулировать процессы роста и развития растений [29]. В литературе встречается много сведений об изоэнзимном составе пероксидазы и ее ИУК-оксидазной функции. Показано, что при фракционировании белков различными способами многим исследователям не удалось обнаружить такого белка, который обладая ИУК-оксидазной активностью, не проявлял бы пероксидазной [17, 24]. В то же время некоторым исследователям удалось отделить ИУК-оксидазную активность от пероксидазной и установить, что в некоторых случаях ИУК-оксидазной активности у изопероксидаз может не быть [33, 34]. Было высказано предположение о том, что ИУК-оксидаза имеет аллостерическую природу и содержит два активных центра, один из которых (собственно оксидазный) имеет высокое сродство к ИУК, но обладает низкой каталитической активностью, а другой (пероксидазный) име-

Таблица 2. Активность гваякол-специфичной пероксидазы в органах сеянцев лиственницы сибирской в зависимости от срока затопления, ΔD мг⁻¹ бел. мин*

Период затопления, дни	Орган	Контроль	Опыт	% от контроля
12	Корни	67.73 ± 0.24	151.99 ± 0.32	224.4
	Ствол	63.54 ± 0.17	119.58 ± 0.19	188.2
	Хвоя	112.02 ± 0.37	63.14 ± 0.12	56.4
18	Корни	199.75 ± 0.76	503.36 ± 1.18	252.0
	Ствол	115.79 ± 0.42	135.34 ± 0.56	116.9
	Хвоя	138.02 ± 0.35	92.61 ± 0.27	67.1
32	Корни	74.86 ± 0.44	218.83 ± 0.61	292.2
	Ствол	263.89 ± 0.59	153.03 ± 0.79	57.9
	Хвоя	149.31 ± 0.84	118.82 ± 0.26	79.5

Примечание. * - Условные единицы (ΔD - изменение оптической плотности в ед. времени).

Таблица 3. Активность ИУК-оксидазы в органах сеянцев лиственницы при корневом анаэробнозе нМмг⁻¹ бел. мин

Период затопления, дни	Орган	Контроль	Опыт	% от контроля
11	Корни	197.72 ± 0.36	303.87 ± 0.61	153.7
	Ствол	157.24 ± 0.18	237.94 ± 0.73	150.9
	Хвоя	65.93 ± 0.23	76.12 ± 0.14	115.5
30	Корни	602.00 ± 0.91	1710.97 ± 1.27	284.2
	Ствол	43.58 ± 0.19	46.64 ± 0.37	107.1
	Хвоя	76.11 ± 0.42	34.76 ± 0.17	66.1

ет низкое сродство к ИУК, но высокую каталитическую активность [27]. Анализируя многочисленные литературные данные, можно сделать вывод о том, что хотя ИУК окисляется пероксидазой, между пероксидазой и ИУК-оксидазой активностями нет прямого соответствия. Изучение соотношений пероксидазной и ИУК-оксидазной активности позволили подтвердить факт существования у растений самостоятельного фермента, осуществляющего разрушение ИУК наряду с пероксидазой.

В настоящем опыте отмечено увеличение активности ИУК-оксидазы в органах опытных растений (табл. 3). При этом чем дольше длится затопление, тем быстрее разрушается ауксин в корнях. Так, через 11 дней от начала эксперимента фермент здесь был активнее, чем в контроле, в 1.5, а через 30 дней в 2.8 раза. Активность ауксиноксидазы в стволиках затопленных растений в первой половине опыта составила 150.9%, а в хвое 115.5% по сравнению с контролем, по мере

увеличения периода затопления активность фермента в надземных органах существенно снизилась.

Высокая активность ИУК-оксидазы была отмечена в органах сеянцев сосны. Так, после 10 дней затопления активность фермента в корнях опытных растений была в 2.7 раза, а в стволиках и хвое в 1.2 и в 1.7 раза выше, чем в контроле [3]. Системе окисления ИУК в организме ИУК-оксидазой отводится важная роль в метаболизме этого важнейшего гормона роста, так как деятельность ауксиноксидазы регулирует уровень ИУК в тканях [7, 35].

Снижение концентрации ауксина вследствие интенсивной деятельности ауксиноксидазы в органах сеянцев лиственницы при корневом анаэробнозе может служить одной из важнейших причин ингибирования ростовых процессов у растений, подвергнутых затоплению.

Продолжительное затопление корней сеянцев лиственницы вызывает снижение как линейных размеров, так и биомассы растений. Так, в результате 30-дневного действия корневого анаэробноза сухой вес одного опытного растения составил в среднем 86.7% от контроля, длина корешков - 61.2%, стволика - 82.8% и хвои - 98.1%.

Выводы. 1. Показателем биохимической адаптации сеянцев лиственницы к избыточному увлажнению почвы является перестройка дыхательного метаболизма, обусловленная регуляцией различных путей дыхания на уровне изменения активности ключевых ферментов.

2. Продолжительное затопление сеянцев лиственницы вызывает изменение дыхательного обмена в направлении усиления гликолиза и ослабления как аэробного, так и апотомического способов дыхания.

3. Торможение роста в условиях корневого анаэробноза позволяет, вероятно, существенно ограничить расход пластических веществ и свести до минимума энергетические затраты, связанные с новообразованием тканей. Такую реакцию сеянцев лиственницы на затопление можно считать приспособительной, позволяющей обеспечить жизнедеятельность растения в экстремальных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев В.Ю., Генорозова И.П., Полякова Л.И., Вартапетян Б.Б. Интенсивность гликолиза и устойчивость к апоксию отдельных корней *Pisum sativum* L. // Физиол. раст. 1996. Т. 43. № 2. С. 272-278.
2. Астафурова Т.П., Вайшеля О.Б., Зайцева Т.Т. и др. Особенности дыхательного метаболизма в листьях гороха при гипобарической гипоксии // Физиол. раст. 1993. Т. 40. № 4. С. 656-661.
3. Балмаева Л.И. Влияние корневого анаэробноза на активность некоторых оксидоредуктаз в органах проростков сосны // Физиология роста и питания хвойных. Красноярск. Красноярское книжное изд-во, 1986. С. 48-58.
4. Балмаева Л.И. Некоторые аспекты биохимической адаптации сосны обыкновенной в связи с условиями существования на верховом болоте // Лесоведение. 1988. № 6. С. 55-64.
5. Головкин Т.К. Дыхание растений. СПб.: Наука, 1999. 205 с.
6. Гринева Г.М. Регуляция метаболизма у растений при недостатке кислорода. М.: Наука, 1975. 280 с.
7. Гуськов А.В., Турецкая Р.Х., Грин Н.Я., Кефели В.И. Влияние ауксина на активность ауксиноксидазы у стеблевых и листовых черенков фасоли в процессе ризогенеза // Физиол. раст. 1980. Т. 27. Вып. 1. С. 573-578.
8. Иванов Б.Ф., Землянухин А.А., Салам М.М. Утилизация экзогенного этанола проростками гороха в бескислородной среде // Физиол. раст. 1989. Т. 36. В. 1. С. 135-142.
9. Кочетов В.Л. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1971. 352 с.
10. Кретович В.Л., Северная Г.А. Влияние молярности буфера, ионов алюминия и рН на растительную малатдегидрогеназу // Биохимия. 1970. Т. 35. № 4. С. 746-752.
11. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 2. С. 453-466.
12. Судачкова Н.Е., Балмаева Л.И. Методика определения активности ИУК-оксидазы в тканях хвойных // Физиолого-биохимические методы исследования древесных растений. Красноярск: Красноярское книжное изд-во, 1977. С. 42-48.
13. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1988. 244 с.
14. Angelov M.N., Sung S.J.S., Doong Ron Lou. et al. Long and short term flooding effects on survival and sink source relationships of swamp-adapted tree species // Tree Physiol. 1996. V. 16. № 5. P. 477-484.
15. Batzli J.M., Dawson J.O. Physiological and morphological responses of red alder and sitka alder to flooding // Physiologia plantarum. 1997. V. 99. № 4. P. 653-663.
16. Carystinos G.D., MacDonald H.R., Monroy L.F. et al. Translocating Pyrophosphatase is Induced by Anoxia or Chilling in Seedlings of Rice // Plant Physiol. 1995. V. 108. № 2. P. 641-649.
17. Choen J.D., Banduraki R. The bound auxin protection of indole-acetic acid from peroxidase catalysed oxidation // Planta. 1978. V. 139. № 2. P. 203-208.
18. Coutts M.R., Armstrong W. Role of Oxidant Transport in the Tolerance of Trees to Waterlogging // Tree Physiology and Yield Improvement / Eds Cannell M.G.R. et al. N. Y.-L. etc.: Academic Press, 1976. P. 361-385.
19. Crawford R.M.M., Baines M.A. Tolerance of anoxia and the metabolism of ethanol in tree roots // New Phytology. 1977. V. 79. № 3. P. 519-526.
20. Dang Q.L., Loeffers V.J., Rothwell R.L., Macdonald S.E. Diurnal variation and interrelations of ecophysiological parameters in three peat land wood species under different weather and soil moisture conditions // Oecologia. 1991. V. 88. № 3. P. 317-324.