

УДК 577.158+581.14

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

И. В. ЗЕЛЕНЕВА

СООТНОШЕНИЕ ПУТЕЙ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИРУВАТА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ГОРОХА

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 28 VI 1971)

На ранних стадиях прорастания внутри семян гороха создаются частично анаэробные условия, связанные с недостаточной проницаемостью кожуры для кислорода. Анаэриоз ведет к накоплению в семядолях этанола и лактата, количество которых достигает максимума к моменту прорыва корешком семенных покровов. С увеличением доступности кислорода в процессе дальнейшего развития семени или при удалении семенной кожуры этанол и лактат быстро исчезают, активно вступая в обмен веществ⁽¹⁻³⁾.

Этанол и лактат образуются из пирувата в реакциях, катализируемых соответственно алкогольдегидрогеназой (АДГ) и лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Поскольку образование лактата и этанола может контролироваться пропускной способностью АДГ и ЛДГ, доступностью НАД, являющегося кофактором в обеих реакциях, и уровнем пирувата — предшественника этанола и лактата, можно было ожидать, что изменение концентрации пирувата окажет влияние на образование этанола и лактата. Исходя из этого предположения, мы исследовали пути превращения пирувата, используя арсенит натрия, который подавляет окисление α -кетокислот, в том числе пирувата, и приводит к накоплению пирувата во многих растительных и животных тканях^(4, 5).

Семена гороха сорта Торсдаг после 6 час. набухания в водопроводной воде или растворе арсенита натрия ($5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ мол/л) переносили во влажную камеру на смоченную водой фильтровальную бумагу. Интенсивность дыхания семян определяли манометрическим методом после 11 час. прорастания, считая с момента погружения семян в воду. Количество этанола и пирувата определяли энзиматическим методом при помощи АДГ и ЛДГ⁽⁶⁾, количество лактата — колориметрическим методом с парафенилфенолом⁽⁷⁾ после 11 и 14,5 час. прорастания. Повторность в опытах 3-кратная.

При постоянной интенсивности дыхания на этом этапе прорастания семян поглощение O_2 и образование CO_2 составляли соответственно 68 и 196 мл/час на одно семя. Арсенит уменьшал поглощение O_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ мол/л, ингибирование не менялось при повышении концентрации до 10^{-3} мол/л и несколько усиливалось при $2 \cdot 10^{-3}$ мол/л.

Концентрация арсенита, мол/л	0	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Ингибирование, %						
O_2	0	29	28	29	34	39
CO_2	0	—	14	20	14	14

Выделение CO_2 подавлялось в меньшей степени, чем поглощение O_2 , и не изменялось при разных концентрациях арсенита. Устойчивое к арсениту дыхание отмечалось ранее в кончиках корня проростков кукурузы, когда увеличение концентрации арсенита с 10^{-3} до 10^{-2} мол/л не снижало остаточного дыхания⁽⁸⁾. Таким образом, обработка семян арсенитом приводит к повышению дыхательного коэффициента, как и в опытах с кончи-

ками корня кукурузы (⁸), срезами стеблей гороха (⁹), срезами корня моркови (¹⁰), бурой водоросли *Ochrotoponas malhamensis* (¹¹). Возможно, это повышение дыхательного коэффициента связано с более быстрым использованием глюкозы в качестве дыхательного субстрата в присутствии арсенита (⁴).

Накопление пирувата начиналось при более высоких концентрациях арсенита, чем снижение интенсивности дыхания: при концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ мол/л уровень пирувата после 11 час. прорастания составлял 111%, а при $2 \cdot 10^{-3}$ мол/л 318% от контроля на воде (табл. 1). Аналогичная зависимость накопления пирувата от концентрации арсенита была получена при определении пирувата колориметрическим методом (¹², ¹³) с 2,4-динитрофенилгидразином. Она выражалась в следующих величинах:

Концентрация арсенита, мол/л	0	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$
Пируват, % от контроля			
после 11 час. прорастания	100	177	300
« 14,5 час. »	100	152	299

После 11 час. прорастания уровень этанола не отличался от контроля и при высоких концентрациях арсенита (табл. 1). Содержание лактата не менялось при повышении концентрации ингибитора до $2 \cdot 10^{-3}$ мол/л и несколько снижалось при $5 \cdot 10^{-3}$ мол/л. Таким образом, накопление пирувата не приводило к усилению образования этанола и лактата.

На скорость превращения пирувата в лактат или этанол может влиять не только концентрация пирувата, но и доступность восстановленного НАД. В наших условиях концентрация НАД-Н, видимо, не являлась ограничивающим фактором, так как за 3,5 часа, от 11 до 14,5 час. прорастания, происходило накопление как этанола, так и лактата (табл. 1). Количество лактата повышалось до 166%, а этанола — до 550% от уровня, имевшегося к 11 час. прорастания.

Накопление этанола и лактата за время опыта свидетельствовало и о том, что системы АДГ и ЛДГ работали не с максимальной мощностью, и их активность не ограничивала скорость превращения пирувата в продукты ферментации. Кроме того, рассчитанная из полученных ранее данных пропускная способность АДГ составляла 64,2 μ мол/час на 1 семя при скорости накопления этанола 1,1 μ мол/час на 1 семя (рассчитана из данных табл. 1). Пропускная способность ЛДГ составляла 16,8 μ мол/час на 100 семян, а скорость образования лактата 4 μ мол/час на 100 семян. Таким образом, потенциальная активность ферментов превышала скорость образования продуктов реакции, хотя всегда остается возможность того, что внутри клетки условия работы ферментов могут быть далеки от оптимальных.

Имеющиеся в литературе данные по влиянию арсенита на превращение пирувата достаточно противоречивы. Давно известно, что в присутствии арсенита в различных тканях животных образуется лактат (⁴). У одних микроорганизмов арсенит вызывает накопление пирувата и тормозит

Т а б л и ц а 1

Влияние концентрации арсенита на содержание пирувата, этанола и лактата (μ мол. на 100 семян) в семядолях гороха после 11 (I) и 14,5 час. (II) прорастания.

Указана квадратичная ошибка среднего, в скобках — число опытов

Концентрация арсенита, мол/л	Пируват		Этанол		Лактат	
	I	II	I	II	I	II
0	$2,8 \pm 0,2$ (6)	$3,1 \pm 0,7$ (8)	$73,0 \pm 2,9$ (2)	$401,9 \pm 38,4$ (5)	$18,0 \pm 2,7$ (13)	$29,9 \pm 3,4$ (14)
$2 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \pm 0,4$ (2)	$2,8 \pm 0$ (2)	—	—	$18,3 \pm 1,1$ (2)	$33,5 \pm 0,4$ (2)
$2 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \pm 0,9$ (4)	$9,0 \pm 1,4$ (4)	$67,0 \pm 7,3$ (2)	$396,3 \pm 31,4$ (4)	$17,7 \pm 0,6$ (2)	$32,8 \pm 2,7$ (4)
$5 \cdot 10^{-3}$	$8,6 \pm 0$ (2)	$11,4 \pm 1,2$ (2)	$79,3 \pm 8,6$ (2)	$434,8 \pm 34,3$ (2)	$13,9 \pm 0,3$ (4)	$23,3 \pm 0,7$ (4)

его дисмутацию (¹⁴), у других ингибирует окисление пирувата, но не затрагивает превращения его в лактат (¹⁵). В клетках бурой водоросли в присутствии $2,5 \cdot 10^{-3}$ *M* арсенита повышается уровень пирувата и появляется лактат и этанол (¹⁴). Обработка арсенитом кончиков корня кукурузы приводит к накоплению этанола и ацетальдегида, но не пирувата (⁸).

В семенах гороха пируват, очевидно, не способен регулировать образование лактата и этанола. В противоположность нашим данным, у других объектов, например в клубнях картофеля при анаэробной ферментации (¹⁶), наблюдается конкуренция за пируват. Полученные результаты свидетельствуют о том, что скорость образования лактата в семенах гороха при анаэробии не может служить количественным показателем скорости гликолитического процесса, в отличие от того, что имеет место в семенах клеверины при искусственной аноксии (¹⁷). Можно предполагать, что в семенах гороха существуют два независимых фонда пирувата: один из которых связан с циклом трикарбоновых кислот, а второй дает начало этанолу и лактату на ранних фазах прорастания семян, по крайней мере до прорыва семенной кожуры.

Автор выражает признательность чл.-корр. АН СССР Ф. Э. Реймерсу за постоянное внимание к работе.

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

Поступило
28 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber, *The Germination of Seeds*, Oxford, 1963. ² E. A. Cossins, *Nature*, **203**, 4948, 989 (1964). ³ D. S. Cameron, E. A. Cossins, *Biochem. J.*, **105**, 1, 323 (1967). ⁴ J. L. Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, **3**, N. Y.—London, 1966. ⁵ D. P. Hackett, In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, **12**(2), 23, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1960. ⁶ H.-U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, N. Y.—London, 1965. ⁷ J. B. Barker, W. H. Summerson, *J. Biol. Chem.*, **138**, 2, 535 (1941). ⁸ H. Beevers, M. Gibbs, *Plant Physiol.*, **29**, 4, 318 (1954). ⁹ G. S. Christiansen, K. V. Thimann, *Arch. Biochem.*, **26**, 1, 248 (1950). ¹⁰ T. A. Rees, H. Beevers, *Plant Physiol.*, **35**, 6, 830 (1960). ¹¹ G. H. Reazin jr., *Plant Physiol.*, **31**, 4, 299 (1956). ¹² G. D. Lu, *Biochem. J.*, **33**, 1, 249 (1939). ¹³ И. Вольф, В кн.: *Биохимические методы анализа растений*, под ред. М. Н. Запрометова, М., ИЛ, 1960, стр. 324. ¹⁴ A. W. Rodwell, E. S. Rodwell, *Austral. J. Biol. Sci.*, **7**, 1, 31 (1954). ¹⁵ J. R. L. Walker, *Biochem. J.*, **72**, 1, 188 (1959). ¹⁶ J. Barker, A. F. Saifi et al., *Proc. Roy. Soc.*, **140B**, 900, 385 (1952). ¹⁷ M. J. Kober, H. Beevers, *Plant Physiol.*, **47**, 1, 48 (1971).