

Э. Е. ХАВКИН, А. А. ПЕШКОВА,
член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АЗОТА НА АКТИВНОСТЬ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ И ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

В гетеротрофный период развития проростка, когда основным источником веществ для синтетических процессов являются запасные отложения семени, в осевой части и некоторых тканях семени уже формируется ферментная система усвоения экзогенного азота (¹, ²), и гетеротрофное по углероду растение приобретает частичную автотрофность по азоту.

При выращивании проростков кукурузы на слабых растворах солей азота происходит небольшое, но статистически значимое ускорение роста осевой части и мобилизации запасов семени (³). Накопление неорганических соединений азота в корне указывает на поглощение извне нитратов и аммония. В связи с этим возник вопрос, вызывает ли поглощение минерального азота корнем индукцию ферментов, участвующих в его восстановлении и ассимиляции. Наиболее интересными ферментами ассимиляции азота являются нитратредуктаза — первый фермент цепи реакций, участвующих в восстановлении нитратов до аммиака, и глутаматдегидрогеназа, катализирующая восстановительное аминирование кетоглутарата — ключевую реакцию в синтезе аминокислот.

Двухдневные проростки кукурузы гибрид Буковинский-3 переносили в кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную раствором KNO_3 (244 мг/л) или $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ (160 мг/л), что соответствует 0,2 нормы азота в питательной смеси Кнопа. В течение трех последующих дней пребывания растений в темноте при 27° ежедневно измеряли прирост корня в длину. Суточный прирост и остальную (базальную) часть корня замораживали сухой углекислотой, отрезки корней растирали в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,1—8,4, содержащем 0,4 моля сахарозы и 0,001 моля цистеина, гомогенат центрифугировали 25—30 мин. при 18 000 об/мин и надосадочную жидкость использовали для определения активности нитратредуктазы по накоплению нитрита за 30 мин. при 27° и глутаматдегидрогеназы — по уменьшению оптической плотности при 340 мμ при восстановительном аминировании кетоглутарата с помощью описанных ранее (¹) методов. Содержание белка в экстрактах определяли по Лоури и др. (⁴) после трехкратного переосаждения трихлоруксусной кислотой. В варианте с KNO_3 использовали для изучения прямой индукции нитратредуктазы и косвенной — глутаматдегидрогеназы, а в варианте с $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ прослеживали только прямую индукцию глутаматдегидрогеназы.

При переносе проростков на среду с нитратами в корнях удваивается содержание свободных нитратов и на 30—80% увеличивается количество аммиака (табл. 1). На среде с фосфорнокислым аммонием количество аммиака возрастает на 25—50%. По-видимому, содержание аммиака в тканях определяется скоростью его ассимиляции и мало зависит от скорости поглощения.

Удельная активность нитратредуктазы в контрольных вариантах невелика, но в присутствии нитратов резко возрастает в обеих частях корня (табл. 2). Возрастные изменения удельной активности у контроль-

Таблица 1

Содержание нитратов (а) и аммиака (б) в $\mu\text{г}$ на один корень при выращивании проростков на растворах солей азота (указана квадратичная ошибка среднего)

Вариант опыта	Дни проращивания			
	2	3	4	5
Контроль				
а	11 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	29 $\pm$ 2
б	27 $\pm$ 2	52 $\pm$ 5	62 $\pm$ 4	83 $\pm$ 4
KNO_3				
а	—	38 $\pm$ 5	42 $\pm$ 3	54 $\pm$ 6
б	—	87 $\pm$ 4	96 $\pm$ 1	112 $\pm$ 10
Контроль				
б	52 $\pm$ 7	79 $\pm$ 7	93 $\pm$ 1	104 $\pm$ 10
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$				
б	—	98 $\pm$ 3	141 $\pm$ 1	147 $\pm$ 3

ных растений незначительны, у опытных наблюдается некоторое снижение к концу периода наблюдений. В базальной части корня удельная активность фермента за время опыта увеличивается в контроле и опыте. Удельная активность нитратредуктазы в суточном приросте почти вдвое выше, чем в базальной части корня. Общая активность фермента в расчете на отрезок суточного прироста в контроле практически остается на постоянном уровне, а в базальной части возрастает по мере увеличения длины этой части корня. При индукции на среде с нитратами абсолютная активность фермента возрастает в 4 раза, независимо от возраста отрезков.

Удельная активность глутаматдегидрогеназы снижается с возрастом корня в суточном приросте и базальной части корня (табл. 3). Поглощение экзогенного аммония приводит к заметному увеличению активности фермента, что позволяет говорить об индукции глутаматдегидрогеназы.

Увеличение активности нитратредуктазы вызывает, по-видимому, накопление аммиака в корнях проростков (табл. 1) и оказывает, таким образом, косвенное влияние на активность глутаматдегидрогеназы. Индукция глутаматдегидрогеназы на нитратном фоне мало отличается от картины, наблюдаемой на аммиачном фоне (табл. 3). Это расходится с данными других исследователей: при длительном выращивании растений сои и подсолнечника активность фермента в корнях на аммиачном фоне была в 2—3 раза выше, чем на среде с нитратами ⁽⁵⁾; в опытах Канамори и др. ⁽⁶⁾ нитраты, в отличие от аммония, вообще не влияли на активность глутаматдегидрогеназы в корнях риса. Абсолютная активность фермента в расчете на отрезок корня в суточном приросте корня кукурузы снижается за период наблюдений, а в базальной части увеличивается (табл. 3).

Прирост корня за 24 часа составляет 40—60 мм, в нем сосредоточены растущие клетки, в которых интенсивно идут процессы новообразования белков, а также зона корневых волосков, участвующая в поглощении экзогенного азота. Индукция ферментов, вызванная накоплением нитратов или аммония, усиливает процессы ассимиляции неорганического азота, что, в свою очередь, стимулируют его поглощение и накопление. Таким образом, поглощение и ассимиляция азота оказывается автокаталитическим процессом.

Для того чтобы установить связь между увеличением активности глутаматдегидрогеназы и синтезом белка в корне, мы использовали специфично действующий ингибитор синтеза белка актидион в минимальной концентрации, подавляющей синтез белка и накопление глутаматдегидрогеназы в корне кукурузы ⁽⁷⁾. Двухдневные проростки переносят

Таблица 2

Активность нитратредуктазы (нмол/за 30 мин.) в отрезках корня при выращивании проростков на KNO_3 (указана квадратичная ошибка среднего)

Дни проращивания	Суточный прирост		Базальная часть	
	контроль	KNO_3	контроль	KNO_3
2 (целые корни)	—	—	$\frac{110 \pm 2}{12 \pm 3}$	—
3	$\frac{217 \pm 3}{35 \pm 2}$	$\frac{980 \pm 6}{170 \pm 8}$	$\frac{110 \pm 2}{15 \pm 7}$	$\frac{390 \pm 4}{71 \pm 8}$
4	$\frac{239 \pm 4}{40 \pm 6}$	$\frac{959 \pm 2}{183 \pm 7}$	$\frac{172 \pm 3}{57 \pm 10}$	$\frac{536 \pm 6}{218 \pm 6}$
5	$\frac{239 \pm 3}{40 \pm 4}$	$\frac{867 \pm 9}{163 \pm 9}$	$\frac{200 \pm 1}{110 \pm 12}$	$\frac{518 \pm 5}{383 \pm 11}$

Примечание. Числа над чертой — удельная активность на 1 мг белка экстракта, под чертой — общая активность в расчете на 1 отрезок корня.

Таблица 3

Активность глутаматдегидрогеназы (нмол/мин) при выращивании проростков на растворах солей азота (указана квадратичная ошибка среднего)

Дни проращивания	Суточный прирост				Базальная часть			
	контроль	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	контроль	KNO_3	контроль	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	контроль	KNO_3
2 (целый корень)	—	—	—	—	$\frac{121 \pm 2}{31 \pm 0,05}$	—	$\frac{96 \pm 3}{17 \pm 0,2}$	—
3	$\frac{178 \pm 4}{38 \pm 0,6}$	$\frac{229 \pm 3}{59 \pm 0,9}$	$\frac{162 \pm 4}{26 \pm 0,6}$	$\frac{210 \pm 5}{43 \pm 0,9}$	$\frac{172 \pm 3}{30 \pm 3}$	$\frac{214 \pm 4}{54 \pm 4}$	$\frac{151 \pm 2}{21 \pm 0,3}$	$\frac{185 \pm 4}{33 \pm 2}$
4	$\frac{121 \pm 3}{35 \pm 0,5}$	$\frac{168 \pm 1}{50 \pm 1,0}$	$\frac{154 \pm 4}{29 \pm 0,3}$	$\frac{212 \pm 6}{40 \pm 0,9}$	$\frac{112 \pm 2}{55 \pm 2}$	$\frac{151 \pm 2}{69 \pm 6}$	$\frac{134 \pm 3}{42 \pm 1}$	$\frac{168 \pm 4}{68 \pm 3}$
5	$\frac{111 \pm 2}{24 \pm 0,2}$	$\frac{172 \pm 4}{37 \pm 1,1}$	$\frac{139 \pm 3}{27 \pm 1}$	$\frac{194 \pm 2}{37 \pm 0,6}$	$\frac{109 \pm 2}{79 \pm 7}$	$\frac{154 \pm 4}{127 \pm 8}$	$\frac{118 \pm 4}{66 \pm 7}$	$\frac{172 \pm 5}{123 \pm 4}$

Примечание. Числа над чертой — удельная активность на 1 мг белка, под чертой — абсолютная в расчете на 1 отрезок корня.

ли в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную водой (контроль) или раствором актидиона ($0,2 \text{ мкг/мл}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (160 мкг/мл) и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + актидион. Актидион снимал индукцию глутаматдегидрогеназы в суточном приросте и базальной части корня, почти не изменяя общее содержание белка в тканях (рис. 1).

Увеличение активности ферментных систем ассимиляции азота обеспечивает, по-видимому, усиление синтеза белка в корне и общее увеличение скорости роста проростка, что приводит к более интенсивному расходованию запасных питательных веществ семени. В опубликованной ранее работе ⁽³⁾ было показано, что поглощение проростком экзогенного азота приводит и к увеличению активности протеолитических ферментов в эндосперме кукурузы. Таким образом, одновременно с поступлением минерального азота извне усиливается использование эндогенных резервов азота.

Индукционное новообразование нитратредуктазы доказано достаточно строго ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Увеличение активности глутаматдегидрогеназы

в растительных тканях в присутствии ионов аммония и торможение индукции ингибиторами синтеза белка наблюдали многие исследователи (^{3, 6, 9, 11-13}), однако новообразование этого ферментного белка в процессе индукции пока однозначно не установлено. Одновременное увеличение активности нитратредуктазы и глутаматдегидрогеназы на нитратном фоне представляет особый интерес в связи с различной локализа-

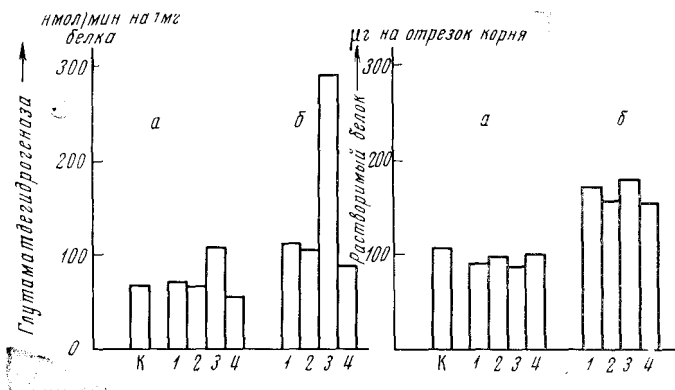


Рис. 1. Удельная активность глутаматдегидрогеназы и содержание белка в отрезках корня (а — базальная часть, б — суточный прирост). К — исходный контроль (целый корень). Через 24 часа: 1 — контроль, 2 — 0,2 мкг/мл актидиона, 3 — 160 мкг/мл $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4 — 0,2 мкг/мл актидион + 160 мкг/мл $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

цией этих ферментов внутри клеток корня (¹⁴). Компартиментация ферментов, участвующих в ассимиляции неорганического азота, и различие в кинетике их индукции заставляет отказаться от представлений о «нитросоме» как структурной единице первичного азотного обмена (¹⁵) в тканях цветковых растений (^{9, 14, 16, 17}). Координированный синтез ферментов ассимиляции азота регулируется, по-видимому, с помощью иных, более сложных, механизмов.

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

Поступило
28 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Е. Хавкин и др., ДАН, **178**, 737 (1968).
- ² F. E. Ferrari, J. E. Varner, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **65**, 729 (1970).
- ³ Э. Е. Хавкин, А. А. Пешкова, Ф. Э. Реймерс, ДАН, **208**, № 5 (1973).
- ⁴ O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- ⁵ G. S. Weissman, Plant Physiol., **49**, 138 (1972).
- ⁶ T. Kanamori et al., Physiol. plantarum, **26**, 1 (1972).
- ⁷ Ф. Э. Реймерс, Э. Е. Хавкин, Физиол. растений, **17**, 337 (1970).
- ⁸ L. Beevers, R. H. Nagevan, Ann. Rev. Plant Physiol., **20**, 495 (1969).
- ⁹ K. M. Joy, Plant Physiol., **44**, 849 (1969).
- ¹⁰ H. R. Zielke, P. Filner, J. Biol. Chem., **246**, 1772 (1971).
- ¹¹ В. Л. Кретович и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 759 (1969).
- ¹² В. Л. Кретович и др., ДАН, **190**, 222 (1970).
- ¹³ В. Л. Кретович и др., ДАН, **202**, 225 (1972).
- ¹⁴ B. J. Miflin, Planta, **93**, 160 (1970).
- ¹⁵ A. P. Sims et al., In: Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants, London — N. Y., 1968, p. 91.
- ¹⁶ G. R. Stewart, Phytochemistry, **7**, 1139 (1968).
- ¹⁷ J. M. Bagley et al., Planta, **105**, 15 (1972).