

57
А-26

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Сибирское отделение
Дальневосточный филиал им. В.Л.КОМАРОВА
Биолого-почвенный институт

На правах рукописи

И.Я.ГОРИС

ДЫХАНИЕ И ФОСФОРНЫЙ ОБМЕН СЕМЯН, ПРОРАСТАЮЩИХ
В УСЛОВИЯХ РАЗНОКАЧЕСТВЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток

1967

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
Сибирское отделение
Дальневосточный филиал им. В.Л.КОМАРОВА
Биолого-почвенный институт

И.Я.ГОРИС

ДЫХАНИЕ И ФОСФОРНЫЙ ОБМЕН СЕМЯН,
ПРОРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ РАЗНОКАЧЕСТВЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель -
доктор биологических наук,
профессор Г.Р.МАТУХИН

Владивосток

1967

57
A26

Исследования проводились в течение 1963-1966г.г. на кафедре физиологии растений и микробиологии Ростовского Ордена Трудового Красного Знамени государственного университета.

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, включая библиографию 244 названий, из которых 72 - иностранных. В работе приведены 18 рисунков и 21 таблица. Разделы реферата соответствуют разделам диссертации.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор В.Ф. АЛЬТЕРГОТ
кандидат биологических наук, доцент В.Е. КОСМАКОВА.

Защита состоится²⁵ декабря 1967 года на заседании Секции биологических и сельскохозяйственных наук Объединенного Ученого Совета Дальневосточного филиала Сибирского отделения Академии Наук СССР.

Отзывы и замечания на реферат в двух экземплярах просим направлять по адресу: г. Владивосток, 22, проспект 100-летия Владивостока 159 "Г", Биолого-почвенный Институт.

Ученый секретарь института
к.б.н. А.В. Крылов.

Автореферат рассмотрен 1967г.
Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Киргизской ССР

296933

Изучение солеустойчивости растений приобрело большую актуальность в связи с решениями XXIII съезда КПСС и последующих пленумов ЦК о коренном изменении положения в сельском хозяйстве и, в частности, об освоении засоленных земель и повышении урожайности возделываемых на этих землях растений.

Как известно, на долю засоленных почв в Советском Союзе приходится около 10% суши /Ковда, 1937, 1947/. Особенно велика площадь под засоленными почвами в Средней Азии, Закавказье, степных районах Украины, Дона, Северного Кавказа, то-есть, в районах, наиболее благоприятных по своим климатическим условиям для возделывания ценных зерновых и технических культур, садоводства и виноградарства. В этих районах засоление почвы наносит огромный ущерб народному хозяйству, которое ежегодно недосчитывает миллионы тонн ценной продукции из-за резкого снижения урожая и ухудшения качества сельскохозяйственной продукции.

Борьба с засолением осуществляется агромелиоративными и биологическими способами. Последний способ должен основываться на точном знании вызываемых засолением нарушений в физиологии растений с самого начального этапа их роста и развития.

Изучением действия засоления на прорастающие семена занимался ряд исследователей /Тулайков, 1922; Сергеев, 1936, 1953; Абуталимов, 1939, 1940; Строгонов, 1949, 1962; Генкель, 1954; Шахов, 1956; Матухин, 1963; Алекперов, 1965; Азизбекова, 1964; Haggison a. King, 1925; Haggis, 1929; Schratz, 1934, 1935; Millington, 1951; Bernstein, 1955, 1958;

ими вскрыты определенные нарушения в физиологии семян, прорастающих в условиях разнокачественного засоления.

Однако до последнего времени не изучались всесторонне и систематически такие стороны обмена веществ у семян, прорастающих в условиях засоления, как дыхание и превращение фосфорорганических

соединений.

Между тем необходимость изучения особенностей дыхания и превращений фосфорных соединений у растений в условиях засоления не вызывает сомнений, так как эти процессы определяют энергетический обмен клеток. Сопряженность процессов окисления и фосфорилирования обуславливает возможность использования энергии окисления для окислительных и является необходимым условием жизни. Передача энергии неосознано связана с последовательным образованием определенных химических соединений, возникающих в ходе преобразования исходной молекулы дыхательного субстрата в конечные продукты распада. Эти соединения могут служить материалом для различных биосинтезов, то-есть, играть большую роль в конструктивном обмене клетки.

Установлено также, что растительный организм может вовлекать в окислительный обмен разнообразные субстраты. Наличие различных путей вовлечения в окислительный обмен субстратов дыхания рассматривается, с современных позиций, как важное приспособительное свойство живой протоплазмы (Рубин, 1960, 1966; Туркова, 1963; Магге, 1961; Вееватт, 1960 и др.). Поэтому при изучении действия на растения различных неблагоприятных факторов важно не только определить начальный и конечный результаты процесса дыхания - интенсивность поглощения кислорода и выделения углекислоты - но и проследить за внутренней стороной этого процесса, то-есть, за путями и этапами превращений дыхательного субстрата.

Используя метод ингибиторного анализа, мы пытались установить, какие отклонения вызывает засоление в ходе процесса дыхания растений, а также как при этом изменяется их фосфорный обмен.

Объектами исследования были взяты растения, характеризующиеся различной солеустойчивостью и разным типом обмена веществ - подсолнечник (сорт Маяк) и ячмень (сорт Паллада 43). Для выяснения влияния хлоридов и сульфатов на растения в период их гетеротрофного развития использовались солевые растворы без внесения в них элементов питания. Проращивание семян проводилось на растворах солей в кюветах по методу Бухгигера (1927), в темноте, при температуре 20°C. Для анализа использовались проростки на третий, шестой и девятый дни прорастания. Опытные растения проращивались как на растворах смеси солей (Строгонов, 1962), соответствующих почвенному раствору естественно засоленной почв, так и в условиях одностороннего засоления растворами чистых солей NaCl и Na₂SO₄. Одностороннее засоление применялось для уточнения степени токсичности ионов Cl⁻ и SO₄²⁻.

Опыты проводились по схеме:

Я ч м е н ь :

смешанное засоление (смесь солей)	одностороннее засоление
1-контроль-дистиллированная вода	1-контроль-дистилл. вода
2-хлоридное засоление - 0,9%	2- 0,1 М NaCl
3-хлоридное засоление - 2,3%	3- 0,2 М NaCl
4-сульфатное засоление - 1%	4- 0,04 М Na ₂ SO ₄
5-сульфатное засоление - 3,7%	5- 0,075 М Na ₂ SO ₄

П о д с о л н е ч н и к

смешанное засоление (смесь солей)	одностороннее засоление
1-контроль-дистиллированная вода	1-контроль-дистилл. вода
2-хлоридное засоление - 0,9%	2- 0,1 М NaCl
3-хлоридное засоление - 1,75%	3- 0,15 М NaCl
4-сульфатное засоление - 1%	4- 0,04 М Na ₂ SO ₄
5-сульфатное засоление - 3,2%	5- 0,075 М Na ₂ SO ₄

В целях выяснения токсического действия ионов Cl^- и SO_4^{2-} на прорастание семян сравнивалось в ходе исследований действие изомолярных концентраций растворов хлористого и сернокислого натрия ($0,1 M NaCl$ и $0,075 M Na_2SO_4$).

В условиях равнозначественного засоления в прораставших семенах ячменя и подсолнечника определялись:

1. интенсивность роста;
2. интенсивность дыхания и активность терминальных оксидаз;
3. динамика фосфорных соединений.

Интенсивность дыхания и активность терминальных оксидаз определяли манометрическим методом (Умбрейт, Буррис, Штоффер, 1951).

Для определения активности ферментов, участвующих в завершающем этапе биохимического окисления (цитохромоксидазы, полифенолоксидазы, аскорбатоксидазы и флавоновых оксидаз), использовались определенные ингибиторы: цианистый калий в концентрации $0,002 M$, α -оксиэнолин- $0,001 M$, диэтилдитиокарбамат натрия - $0,005 M$. Это дало возможность дифференцировать активность каждой оксидазы (Джеймс, 1956; Туркова, 1963).

Для определения качественной характеристики начальных путей окислительного процесса использовался фтористый натрий в концентрации $0,02 M$, который, ингибируя активность энзима, подавляет гликолиз. Указанные растворы вводились в проростки методом вакуум-инфильтрации.

Динамика фосфорных соединений в проростках ячменя и подсолнечника проводилась по методике, описанной В.Г. Конаревым (1959) с некоторыми изменениями. Содержание неорганического фосфата и фосфора органических соединений кислоторастворимой фракции (после мокрого озоления в смеси серной и хлорной кислот) определяли на фотоэлектроколориметре ФЭК М-1 по методу Фиска и Суббароу.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Рост проростков в условиях засоления.

Результаты исследований показали, что воздействие солей на растения вызывает резкое торможение ростовых процессов в начале их вегетации, выражающееся в отставании роста стебля и корневой системы, по сравнению с контрольными проростками. Угнетение роста и развития стебля и корня проростков зависит как от степени засоления, так и от его качества. При одностороннем засолении хлористыми и сернокислыми солями натрия наиболее угнетающее воздействие на проростки обеих культур при одинаковом осмотическом давлении раствора оказывала сульфат-ион. При засолении смесью солей более угнетающее действие на рост растений оказало хлоридное засоление. Как отмечается в литературе, торможение роста прораставших на засолении семян обуславливается угнетением гидролитической активности ферментов (Бойко, 1956; Матухин, 1963), а также снижением скорости передвижения продуктов гидролиза пластических веществ в самом проростке (Удовенко, 1965, 1966). Кроме того, угнетение роста в условиях засоления связывают с потерей физиологической связи между клетками и согласованности в процессах обмена веществ в растительном организме (Строгонов, Окина, 1961). Однако полученные нами данные вскрывают и другие стороны нарушения физиологии прораставших семян в условиях засоления.

Интенсивность дыхания у семян, прораставших на солевых растворах.

Изучение дыхания прораставших в условиях засоления семян ячменя и подсолнечника показало, что хлориды и сульфаты снижают интенсивность окислительного процесса. Величина дыхания проростков находится в обратной зависимости от концентрации окружающего про-

рости раствора, а именно, чем выше концентрация солевого раствора, тем ниже интенсивность дыхания прорастающих семян. Если интенсивность дыхания у проростков, выращиваемых на растворах с невысокими концентрациями солей (хлоридное засоление - 0,9% и сульфатное засоление - 1%), в основном, приближается к контролю, то у семян, прорастающих на растворах с высокими концентрациями солей, окислительный процесс сильно угнетен, особенно, у проростков на хлоридном засолении 2,3%. Отмечено также, что при сравнении интенсивности дыхания у семян, прорастающих на растворах солей с изоосмотическими концентрациями хлорида и сульфата натрия ($0,1 \text{ M NaCl}$ и $0,075 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$), более отрицательное действие на окислительный процесс в проростках ячменя и подсолнечника оказывал раствор сернистого натрия.

Литературные данные по влиянию засоления на дыхание прорастающих семян крайне противоречивы. Некоторые авторы указывают на снижение интенсивности дыхания у растений на засолении в первоначальный период их развития. (Сергеев, 1936, 1953; Куширенко, 1950; Алекперов, 1960; Матушкин, 1963 и др.). Другие исследователи отмечают усиление дыхания прорастающих семян под влиянием солей (Марголина, 1950; Максимова, 1964; Удовенко, 1964; Приходько, 1966 и др.). Большие затруднения в установлении какого-либо четкого и определенного вывода относительно природы действия засоляющих ионов на окислительный процесс связаны с тем, что еще далеко не полностью выяснено влияние солей на комплекс окислительных ферментов, участвующих в дыхании, энергетическая сторона окислительного процесса у растений на засоленном фоне, а также механизм действия отдельных ионов. Исходя из того, что дыхание является глубоко интегральным процессом, многоступенчатым актом ферментативного превращения субстратов дыхания, величина его общего уровня, естественно, зависит от активности отдельных биокаталитических систем и их звеньев.

Поэтому точка зрения исследователей (Матушкин, 1963; Алекперов, 1965), полагающих, что понижение дыхания проростков на засолении обусловлено угнетением деятельности окислительных ферментов, в частности, терминальных оксидаз, кажется нам более приемлемой. Однако нельзя не учитывать и того факта, что в условиях засоления в прорастающих семенах замедляется мобилизация запасных веществ, что не может не отразиться на интенсивности окислительного процесса в целом. Необходимо также отметить, что такое угнетение дыхания, обусловленное рядом вышеперечисленных изменений в метаболизме прорастающих на засолении семян, наблюдается в проростках, произрастающих на растворах с высокими концентрациями смеси солей, а также в условиях одностороннего засоления. Это объясняется, очевидно, тем, что прорастание семян на растворах с высокими концентрациями смеси солей сопровождается поступлением последних в растительные клетки в значительном количестве, что оказывает влияние на состояние биомембран, изменяя их адсорбционные свойства и нарушая согласованность и направленность ферментативных процессов. Одностороннее засоление, как известно, обуславливает более резкие изменения в обмене веществ, поэтому растворы чистых солей NaCl и Na_2SO_4 , даже в невысоких концентрациях, вызывают угнетение дыхания семян, прорастающих в этих условиях.

Вопрос о механизме действия отдельных ионов солевого раствора на процесс дыхания является сложным и несмотря на многочисленные исследования в области солеустойчивости растений, продолжает оставаться дискуссионным. Тем не менее, полученные нами данные позволяют отметить, что в условиях засоления растворами смеси солей, соответствующих почвенному раствору естественно засоленных почв, четко выявилось более отрицательное действие на дыхательный метаболизм проростков растворов хлоридного засоления, пре-

обладанием ионов Cl^- по сравнению с сульфатным типом засоления. Резкое угнетение дыхания прорастающих семян на растворах хлоридного засоления (2,3% - для ячменя и 1,75% - для подсолнечника) обусловлено, очевидно, не только токсическим действием ионов Cl^- , но и более интенсивным их накоплением в органах растений, по сравнению с сульфатным засолением (Строгонов, 1962). Кроме того, более отрицательное действие хлоридного засоления на окислительский процесс прорастающих семян обуславливается и значительным изменением соотношения минеральных элементов в органах растений, которое, по данным Б.П.Строгонова, наиболее выражено в условиях хлоридного засоления. Так, в опытах этого автора в листьях клеверника на хлоридном засолении накапливалось, кроме значительного количества хлора, в несколько раз больше ионов Na^+ , по сравнению с сульфатным засолением.

При прорастании семян в условиях одностороннего засоления выявлялось большее угнетение дыхательного процесса на ранних фазах развития растений под влиянием сульфат-ионов. Очевидно, действие иона SO_4^{2-} в условиях одностороннего засоления проявляется, прежде всего, в сильном обезвоживании протоплазмы молодых растительных клеток, нарушении деятельности дыхательных ферментов, что ведет к угнетению дыхательного метаболизма прорастающих семян.

Качественные изменения в дыхании проростков на засолении.

При изучении дыхательного метаболизма прорастающих в условиях засоления семян была сделана попытка выявить качественные особенности окислительского процесса у проростков. Как известно, фторид натрия, подавляя деятельность ферментов гликолиза, но влияет на реакции гексозомонофосфатного цикла (Дэйвис, 1956 и др.). Поэтому по величине дыхания, чувствительной и устойчивой к этому

ингибитору, можно условно судить об участии гликолитического и гексозомонофосфатного (ГМФ) путей распада дыхательного субстрата в общем дыхательном метаболизме растений.

Результаты исследований показали, что под влиянием солей в проростках происходят значительные изменения в соотношении начальных путей дыхания. Данные представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1.

Влияние растворов смеси солей на участие гексозомонофосфатного пути окисления в общем дыхании проростков ячменя.

(ГМФ-дыхание в % от общего дыхания)

Варианты опыта	Дни прорастания		
	Третий	Востой	Девятый
Контроль-дистилл. вода	56,3	47,5	48,4
Хлоридное засоление 0,9%	57,7	43,3	45,2
" " 2,3%	77,7	69,8	65,0
Сульфатное засоление 1%	78,4	70,5	83,5
" " 3,7%	73,2	86,5	90,2

Полученные данные показывают, что в условиях засоления смеси солей (смешанное засоление) в прорастающих семенах усиливается доля гексозомонофосфатного пути дыхания и, соответственно, уменьшается распад дыхательного субстрата по гликолитическому, "генеральному" пути дыхания. В семенах, прорастающих на сульфатном засолении, наблюдается по-

степенное усиление ГМФ-пути окисления, вплоть до девятого дня прорастания, когда все дыхание, в основном, направлено по гексозомонофосфатному пути.

Прорастание семян на растворах чистых солей NaCl и Na₂SO₄ также сопровождается изменениями в соотношении ГМФ-пути и гликолиза. Так, из данных таблицы 2 видно, что в первые дни прорастания на растворах хлоридов и сульфатов в дыхательном метаболизме проростков ячменя резко усиливается окисление субстрата по ГМФ-пути. К девятому дню прорастания доля гексозомонофосфатного пути в дыхании проростков с небольшими концентрациями солей уменьшается, и соотношение ГМФ-пути и гликолиза в общем дыхании приближается к контролю.

Таблица 2.

Влияние одностороннего засоления на участие гексозомонофосфатного пути окисления в общем дыхании проростков ячменя. (ГМФ-дыхание в % от общего дыхания)

Варианты опыта	Дни прорастания		
	Третий	Шестой	Девятый
Контроль - дист. вода	52,2	46,3	42,8
0,1 М NaCl	92,8	77,5	45,4
0,1 М NaCl	88,6	79,9	64,5
0,04 М Na ₂ SO ₄	77,7	55,2	49,8
0,075 М Na ₂ SO ₄	73,1	75,8	65,8

Реакция проростков подсолнечника на присутствие солей в растворе, в основном, идентична с проростками ячменя, хотя

и у контрольных растений подсолнечника величина дыхания, направленного по гексозомонофосфатному пути в первый срок определения является несколько повышенной, что, очевидно, обусловлено характером запасных веществ подсолнечника.

Таким образом, действие ионов солевого раствора на прорастающие семена приводит к перераспределению начальных путей дыхания: гликолитического и гексозомонофосфатного - в сторону ГМФ-пути. Превращение субстратов дыхания в ходе окислительно-восстановительных реакций в энергию фосфатных связей, механическую и осмотическую энергии. Образование макроэнергетических связей АТФ - основной путь запасаения энергии, на долю которого приходится более 50% общего количества всей выделенной энергии в процессе дыхательного метаболизма (Скулачев, 1962; Чанс, Хаджихара, 1962; Ленинджер, 1966 и др.). Интерес с точки зрения образования энергии АТФ, представляет не собственно гликолитический путь, в ходе которого образуется всего лишь 2 моля АТФ, а идущий после него цикл Кребса. При угнетении гликолиза в дыхании семян, прорастающих в условиях засоления, уменьшается, следовательно, возможность образования значительных количеств АТФ в цикле Кребса.

Несмотря на то, что растительные организмы в процессе своего исторического развития смогли выработать несколько путей распада дыхательного материала, все же дихотомический путь, совместно с циклом Кребса, является "генеральным" путем превращения углеводов, дающим наибольший выход энергии. Увеличение доли ГМФ-пути в дыхании семян, прорастающих на солевых растворах, должно понижать энергетическое снабжение тканей. Однако, известно, что под действием неблагоприятных факторов (засуха, низкие и высокие температуры, ионизирующее излуче-

ния, заражении вирусными болезнями, и им может доминировать (засоление) в дыхании растений усиливается гексозомонофосфатный путь превращений дыхательного субстрата (Рубин, Озерцовская, 1959; Зеленева, 1964; Семихатова, Плива, 1965; Рубин, Ладыгина, 1966; Девис и др., 1966; Марре, 1961). Можно полагать, что увеличение доли гексозомонофосфатного пути окисления в процессе дыхания при неблагоприятных условиях жизнедеятельности растений является реакцией общего значения.

По-видимому, при неблагоприятных условиях жизнедеятельности растений возникает необходимость ускорения высвобождения энергии, и в дыхании растений происходит переключение путей окисления на менее производительный по выходу энергии, но более быстрый по времени, гексозомонофосфатный путь дыхания.

Результаты исследования показали также, что к десятому дню прорастания у опытных проростков на растворах с небольшой концентрацией солей доля ГМФ-пути в общем дыхании снижается. Это, возможно, говорит о том, что в период гетеротрофного развития проростков происходит постепенное приспособление обмена растительного организма к воздействию солевого раствора, и в конечном итоге, в дыхании проростков начинает преобладать гликолитический путь дыхания, энергетически более эффективный. Только в условиях действия растворов солей с высокими концентрациями и на десятый день прорастания семян окисление ГМФ-пути продолжало оставаться преобладающим в общем дыхании растений, что, несомненно, свидетельствует о наличии более глубоких нарушений дыхательного метаболизма последних.

Влияние засоления на активность терминальных оксидаз в проростках ячменя и подсолнечника.

Как известно, общий уровень дыхательного метаболизма во многом зависит от завершающих этапов окисления, осуществляющихся при участии терминальных оксидаз. Данные проведенных исследований показали, что в процессе прорастания семян на засолении наблюдаются большие изменения в деятельности ряда терминальных оксидаз: цитохромоксидазы, полифенолоксидазы, аскорбатоксидазы и флавоновых оксидаз.

Так, в условиях засоления резко снижается та часть дыхания в проростках ячменя, которая обусловлена деятельностью цитохромоксидазы. Угнетение активности этого фермента возрастает с увеличением концентрации ионов Cl^- и SO_4^{2-} . Активность медьсодержащего фермента-полифенолоксидазы (ПО) в проростках на растворах с небольшими концентрациями солей на 3-6 дни прорастания несколько выше, чем на контроле, однако, к десятому дню активность полифенолоксидазы в опытных растениях резко понижается. При одностороннем засолении и на растворах смеси солей с высокой концентрацией солевых ионов Cl^- и SO_4^{2-} активность полифенолоксидазы проростков сильно понижается, по сравнению с контролем.

Деятельность аскорбатоксидазы (АО) в опытных проростках также подвержена некоторым изменениям. Так, результаты опытов показали, что активность аскорбатоксидазы опытных проростков, особенно, на растворах с высокой концентрацией солей понижается, по сравнению с контролем. Исключение составляют проростки сульфатного засоления (варианты I₅ и П₀₄ и

Na_2SO_4), где деятельность аскорбатоксидазы несколько повышается, по сравнению с аскорбатоксидазной активностью в контрольных проростках. Характерным для проростков, вегетирующих в условиях засоления, оказалось повышение активности флавоновых оксидаз (FO) во все сроки определения на растворах с небольшой концентрацией концентрацией солей (хлоридное засоление - 0,9%, 0,1 M NaCl; сульфатное засоление - 1%, 0,64 M Na_2SO_4). В проростках, вегетирующих на растворах сильного хлоридного и сульфатного засоления, активность флавоновых оксидаз также постепенно повышается и к девятому дню прорастания почти достигает величин активности FO на контроле, в то время как деятельность других изучавшихся оксидаз в этих условиях оказывается резко пониженной. Подобная закономерность, но с некоторыми вариациями, наблюдалась и в проростках подсолнечника.

Следовательно, результаты опытов по определению активности терминальных оксидаз в прорастающих на засолении семенах ячменя и подсолнечника показывают, что солевые растворы вызывают угнетение деятельности ферментов, участвующих в завершающих этапе биологического окисления. Это, естественно, отражается и на общем уровне дыхательного метаболизма, что показано нашими опытами, так как на долю окислительных реакций с участием конечных оксидаз приходится значительная часть кислорода, активируемого последними.

Каким же образом можно объяснить такую перестройку дыхательных систем, которая происходит в прорастающих на засолении семенах?

Как установлено в последнее время, окислительные ферменты, в основном, сосредоточены на поверхности митохондрий, в их

наружной мембране (Туркова, 1963; Рубин, Ладигина, 1966; Ленидзер, 1966; Диксон и Узбо, 1966 и др.). Из других клеточных компонентов только микросомы обладают дыхательной активностью, однако, по количеству потребленного кислорода они значительно уступают митохондриальной фракции (Скулчев, 1962; Узбо, 1966; Krisch, Staudinger, 1959; Raw, Mahler, 1959).

Если принять во внимание, что свыше 90% активности цитохромоксидазы приходится на долю митохондриальных частей (Hogboom et al, 1946; Green, 1956; James, Das, 1957), то можно полагать, что наблюдаемое в наших опытах снижение активности этого фермента происходит вследствие накопления солей в митохондриальном аппарате клеток (Agiza, 1956 а, б; Sol, 1958 и др.). Аскорбатоксидаза и полифенолоксидаза находятся в растворимой части клетки, но некоторое количество этих оксидаз имеется и в митохондриях (Михлин, 1960; Рубин, Ладигина, 1966; Давис и др., 1966; и др.). Очевидно, нарушение деятельности митохондриального аппарата клеток в результате воздействия солевых ионов Cl^- и SO_4^{2-} и приводит к снижению активности металлосодержащих оксидаз: цитохромоксидазы, полифенолоксидазы и аскорбатоксидазы, проявляющих свое действие в этой зоне. Вследствие этого происходит резкое понижение тканевого дыхания в прорастающих на засолении семенах.

Известно, например, что перегрузка митохондрий хлором приводит к снижению интенсивности дыхания тканей (Robertson, 1955 и др.). Флавоновые оксидазы, окислительно-восстановительный потенциал которых ниже, чем у металлосодержащих оксидаз, проявляет свое действие, преимущественно, во внемитохондриальной зоне. Возможно, это и является одной из причин,

обуславливающих устойчивость данной группы растительных оксидов к действию солевого раствора.

Как показано в наших опытах, активность цитохромоксидазы в проростках подсолнечника на растворах с небольшой концентрацией солей в растворе повышается, по сравнению с контролем. Столь резкое различие в деятельности цитохромоксидазы прорастающих семян ячменя и подсолнечника объяснить пока довольно трудно. Возможно, что значительное влияние на активность фермента оказывают продукты измененного обмена, возникающие в результате тех сложных нарушений, которые вызывают ионы Cl^- и SO_4^{2-} в физико-химическом состоянии протоплазмы и содержащихся в ней органоидов. Так известно, что механическое повреждение, замораживание, выдерживание в гипотонической среде митохондрий вызывает выход ферментов в растворимую часть клетки. Считают также, что причиной выхода ферментов является нарушение липопротеидного барьера оболочки амбосом, что играет важную роль в процессах некроза. (Вендлан, ван Сакре-хонт, 1959). Возможно, что в проростках подсолнечника, являющегося менее солеустойчивой культурой, по сравнению с ячменем, происходят также нарушения целостности митохондриального аппарата, которые вызывают выход цитохромоксидазы в растворимую часть клетки, и как следствие этого, относительное увеличение ее активности.

Итак, действие солей на терминальную часть окислительного процесса сказывается, прежде всего, в снижении деятельности металлоидных оксидов, в частности, цитохромоксидазы. Полифенолоксидаза, и особенно, аскорбатоксидаза, проявляющие свое действие, в основном, в глатоплазме, являются относитель-

но более устойчивыми из металлоидных оксидов к действию солевого раствора.

Известно, что смена окислительных систем создает и разные типы дыхания, в результате чего происходит образование новых химических соединений и другой физико-химической среды в клетках. Как было показано в наших опытах, в дыхании проростков на засолении усиливается начальный этап распада дыхательного субстрата по пути "усекования" молекул гексозы, по пути гексозомонофосфатному. Перенос же электронов от ГМФ-пути на O_2 осуществляется через глататокредуктазу и аскорбатоксидазу (Карсон, 1957), которые обнаруживают свое действие, в основном, в глатоплазме. В наших опытах также отмечается некоторое повышение активности аскорбатоксидазы в проростках на растворах с небольшой концентрацией солей, особенно, сульфатов. Усиление деятельности аскорбатоксидазы на сульфатном засолении, возможно, связано с увеличением количества соединений с сульфгидрильными группами в условиях действия иона SO_4^{2-} и, в первую очередь, с увеличением количества глататона (Строгонов, 1962; Павлова, 1966). Возможно также, что усиление деятельности аскорбатоксидазы на сульфатном засолении, а также возрастание доли гексозомонофосфатного пути окисления дыхательного субстрата в общем дыхании проростков этих вариантов засоления являются процессами взаимосвязанными и взаимообусловленными.

Однако, в целом, деятельность металлоидных оксидов в прорастающих на засолении семенах, снижается по сравнению с контролем, в то время как активность флавоновых оксидов усиливается. Смена менее устойчивой к действию солей группы ме-

Центральный институт биологических наук
 Биологический институт
 Академии наук Киргизской ССР

таисодержащих оксидов, особенно, цитохромоксидазы на систему биокатализаторов, являющуюся более устойчивой к изменяющимся условиям среды, систему флавоновых оксидов, является характерной ответной реакцией проростков на присутствие в растворе солевых ионов. Эта смена отдельных ферментных систем, как показали исследования Е.В.Максимовой и Г.Р.Матухина (1963), сохраняется в течение всего периода вегетации.

Влияние засоления на фосфорный обмен прорастающих семян ячменя и подсолнечника

Окислительные процессы в тканях растительных и животных организмов тесно связаны с превращениями фосфорных соединений, так как в ходе дыхания и брожения происходит трансформация потенциальной химической энергии различных органических соединений в энергию макроэргических фосфатов. Известно также, что содержание кислоторастворимых фосфорорганических соединений может быть одним из показателей активности растительных организмов. Вследствие этого, изучение метаболизма соединений кислоторастворимой фракции, таких как неорганический фосфат, свободные нуклеотиды, фосфорилированные сахара, представляет значительный интерес для выяснения их роли в регуляции тончайших физико-химических процессов в тканях и органах растений.

Результаты проведенных исследований показали, что засоление влияет на динамику фосфорсодержащих веществ в прорастающих семенах ячменя и подсолнечника. Так, под влиянием засоряющих ионов в стеблях и корнях проростков снижается содержание неорганического фосфата, особенно, на растворах с высокой концентрацией солей.

Таблица 3.

Влияние растворов смеси солей на содержание неорганического фосфата в проростках подсолнечника (в мг % на 1 г сух. в-ва)

Вариант опыта	Дни прорастания		
	Третий	Шестой	Девятый
Стебли			
Контроль - дист. вода	171,8±5,3	189,3±3,5	236,5±2,3
Хлоридное засоление 0,9%	67,8±4,8	89,0±4,6	107,5±4,1
" " 1,75%	44,4±5,9	48,4±5,7	118,1±2,7
Сульфатное засоление 1%	165,5±5,1	160,9±4,1	106,3±3,3
" " 3,2%	51,6±6,8	75,0±7,0	53,6±5,9
Корни			
Контроль - дист. вода	149,8±2,4	184,7±4,1	204,0±3,9
Хлоридное засоление 0,9%	148,7±2,7	160,5±3,8	113,2±5,2
" " 1,75%	-	-	-
Сульфатное засоление 1%	116,8±3,1	193,2±5,4	207,9±2,9
" " 3,2%	-	-	-

Очевидно, ионы Cl^- и SO_4^{2-} замедляют высвобождение неорганического фосфата из запасных фосфорсодержащих веществ семян. Это, возможно, происходит вследствие угнетения деятельности соответствующих ферментов и влечет за собой нарушение энергетического обмена прорастающих семян из-за недостаточного поступления неорганического фосфата в реакции внутриклеточного метаболизма. Так, Удовенко (1964, 1966) показал, что ионы хлора тормозят включение поглощенного семенами изотопа P^{32} в органические соединения фосфора, т.е. самым замедляя синтез ви-

сокомолекулярных веществ.

Кроме того, результаты опытов показали, что в проростках на засолении снижается содержание фосфорилированных сахаров. Уменьшение количества сахарофосфатов в проростках обуславливается, очевидно, тем, что в условиях действия солевых растворов не только уменьшается содержание растворимых углеводов в прорастающих семенах (Бойко, 1956, Матухин, 1963), но и замедляется включение неорганического фосфата в органические соединения. Аналогичное уменьшение количества фосфорилированных сахаров в листьях отмечается и при действии на растения засухи (Должанец и Корсаков, 1959), охлаждения (Куширенко, 1961), что авторами характеризуется как нарушение энергетического обмена растительных организмов.

Данные проведенных исследований показали также увеличение количества нуклеотидов в проростках обеих культур под влиянием засоления. Особенно резко возросло количество нуклеотидов в проростках на растворах с токсическими концентрациями солей (табл. 4).

Не исключено, что в условиях засоления повышение общего содержания нуклеотидов в проростках обуславливается тем, что под влиянием высоких концентраций ионов Cl^- и SO_4^{2-} происходят изменения в метаболизме проростков, которые вызывают не только сильное угнетение роста и подавление синтеза нуклеиновых кислот (Алисова, 1963, 1967), но и частичное разрушение полинуклеотидных молекул, их деструктуризация. Последнее и приводит к повышенному накоплению свободных нуклеотидов в опытных проростках. Кроме того, присутствие больших количеств ионов Cl^- и SO_4^{2-} в растворе, очевидно, вызывает и качественные изменения в составе свободных нуклеотидов прорастающих семян.

Таблица 4.

Влияние растворов смеси солей на содержание нуклеотидов в проростках подсолнечника (в мг % на сух. в-во)

Вариант опыта	Дни прорастания		
	Третий	Восьмой	Десятый
Стебли			
Контроль - дист. вода	86,7±1,8	31,9±2,3	35,5±2,8
Хлоридное засоление 0,9%	164,4±2,4	57,2±4,1	70,7±4,3
- " - 1,75%	172,2±3,5	114,2±5,2	112,3±2,9
Сульфатное засоление 1%	147,0±2,9	56,8±3,8	50,7±5,1
- " - 3,2%	163,5±3,1	141,5±4,5	124,5±4,6
Корни			
Контроль - дист. вода	11,4±3,1	35,0±4,1	18,1±2,9
Хлоридное засоление 0,9%	14,8±2,9	32,7±3,2	8,2±4,1
- " -	-	-	-
Сульфатное засоление 1%	11,0±2,0	33,8±4,5	12,8±3,7
- " - 3,2%	-	-	-

Так, некоторыми авторами установлено, что действие инфекции (Weitzmann, 1961), высоких температур (Альтергот, 1963) и недостатка влаги (West, 1962) на прорастающие семена вызвало не только повышение количества нуклеотидов, но и снижение содержания полинуклеотидов.

Таким образом, отмеченное в результате проведенных исследований замедление высвобождения неорганического фосфата из запасных фосфорсодержащих веществ проростков под влиянием ионов Cl^- и SO_4^{2-} , по-видимому, вызывает нарушение процессов фосфорилирования сахаров и нуклеотидов, что, естественно, от-

ражается на энергетическом обмене прорастающих семян. Под влиянием токсических концентраций солей в растворе, очевидно, происходит и деструкция сложных фосфорорганических соединений: нуклеотидов и нуклеиновых кислот, в связи с чем и подавляется рост проростков. Подавление митотической деятельности меристемных клеток корня проростков в условиях засоления отмечается в исследованиях Л.Д.Амиловой (1964) и Л.Ф.Гайдамыкиной (1967).

Заключение

Результаты проведенных нами исследований позволяют охарактеризовать некоторые существенные стороны изменения метаболизма семян, прорастающих в условиях засоления.

Процесс прорастания семян связан с интенсивным превращением запасных веществ в соединения, необходимые для построения органов и тканей развивающегося проростка, а также с не менее интенсивными превращениями энергии при активной работе многочисленных ферментов.

В условиях засоления в прорастающих семенах снижается скорость начального этапа превращения запасных веществ - гидролиза углеводов, вследствие угнетения деятельности соответствующих ферментов-амилаз, что отрицательно влияет на накопление простых сахаров в развивающемся растении (Бойко, 1956; Матухин, 1963). Кроме того, под действием засоряющих ионов снижается скорость передвижения продуктов гидролиза углеводов в самом проростке (Удовенко, 1965).

Использование сахаров в различных процессах метаболизма в большинстве случаев требует предварительной подготовки их, сущность которой состоит в том, что химическая инертность простых сахаров преодолевается путем образования фосфорных

эфиров сахаров и изменения их внутренней структуры. Таким образом, интенсивность и направленность превращений сахаров в прорастающих семенах непосредственно связана с их фосфорным обменом. Последний подвержен в условиях засоления определенным изменениям.

Нами установлено, что под действием избыточной концентрации солей в прорастающих семенах нарушается гидролиз запасных фосфорсодержащих соединений, уменьшается содержание неорганического фосфата и сахарофосфатов. Степень подавления этих процессов находится в прямой зависимости от концентрации солевого раствора и от его качественного состава. Наиболее резкое нарушение фосфорного обмена прорастающих семян наблюдалось при одностороннем засолении сульфатом натрия (0,075 M Na_2SO_4) и при смешанном засолении с преобладанием ионов хлора в растворе (для ячменя - 2,3%, для подсолнечника - 1,75%).

Нами также показано, что в условиях засоления в прорастающих семенах происходит ^{гидролиза} подавление и усиление гексозомонофосфатного пути окисления, особенно, в условиях сульфатного засоления. Как известно, гликолиз требует для своих превращений 2-кратно фосфорилированной молекулы гексозы, в то время как в гексозомонофосфатном пути окислительным превращениям подвергается монофосфорный эфир гексозы. Это наводит на мысль, что усиление гексозомонофосфатного пути окисления в прорастающих на засоленных семенах обусловлено как недостаточным содержанием в них лабильного фосфора, вследствие подавления гидролиза фосфорсодержащих запасных соединений, так и, по-видимому, угнетением под влиянием избыточного количества ионов Cl^- и SO_4^{2-} ферментов, катализирующих реакции фосфорилирования. Возможность угнетения активности этих ферментов в растениях в условиях

засоления вытекает из того известного факта, что фосфорилзы легко высаливаются. Важно и то, что высаливающая способность солей, как установил Гофмейстер, зависит от аниона соли. Если для аниона Cl^- концентрации, производящая высаливание, равна 3,62 М ($NaCl$), то для SO_4^{2-} (Na_2SO_4) эта концентрация составляет всего 0,8 М, т.е. солевой эффект иона SO_4^{2-} во много раз превышает солевой эффект хлор-иона.

В связи с этим представляет интерес, что хлор- и сульфат-ионы вызывают неодинаковое торможение активности фосфоглюкому-тазы (Клепов, по Узбу, 1966), причем, ингибиторная константа для сульфат-иона имеет величину 0,35 мМ, в то время как для хлора константа ингибирования фермента равна 3,6 мМ. Хотя эти данные получены при работе с очищенными ферментами животных организмов, можно полагать, что аналогичным образом реагирует на хлоридные и сульфатные ионы и растительные фосфорилазы. Не исключено также, что угнетение активности фосфорилаз может обуславливаться и другими причинами. Так, Узбу (1966) полагает, что снижение активности энзимов под влиянием одновалентных ионов (Na^+ , K^+ , Cl^- и др.) может быть связано с увеличением ионной силы, влияющей на константу диссоциации функциональных групп ферментов вблизи его активного центра, а также снижающей подвижность белков ферментов. Это может привести к изменениям сродства фермента к его субстрату и, соответственно, снизить его активность.

Не исключена возможность образования и комплексов солей с ионами металлов, входящих в активный центр ферментов, что также подавляет активность последних. Так, Дорелл и Холмберг (цит. по Зингер и Кирия, 1959) установили, что на активность фермента оказывает глубокое влияние природа и концентрация

анионов солей, причем, polyvalентные анионы: сульфат, цитрат и др. оказывают более ингибирующее действие, чем одновалентные анионы.

Каков же биологический смысл усиления гексозомонофосфатного пути окисления в дыхании семян, прорастающих в условиях засоления? Совершенно очевидно, что окисление по ГМ-пути экономит трату сахаров в акте дыхания. Поскольку в условиях засоления в прорастающих семенах подавляется гидролиз запасных углеводов, то необходимость переключения на гексозомонофосфатный путь становится вполне оправданной.

В то же время нельзя не считаться с тем, что усиление этого пути окисления дыхательного материала может сказаться отрицательно на энергетическом обмене прорастающих в условиях засоления семян, так как выход энергии при гексозомонофосфатном пути окисления значительно меньше, чем при генеральном пути распада дыхательного субстрата - гликолизе и цикле Кребса. Однако в гексозомонофосфатном пути окисления гексоза подвергается более быстрой превращению, следовательно, скорость подачи энергии во внутриклеточном метаболизме возрастает. Это должно, несомненно, играть существенную, положительную роль в жизнедеятельности проростков на засолении, так как, по мнению некоторых авторов, при неблагоприятных условиях существования для организма важно не столько "суммарное количество энергии, как скорость ее высвобождения" (Звлейем, 1950).

Кроме того, с переключением обмена на аэробный путь окисления увеличивается количество других субстратов окисления, что расширяет метаболические возможности организма в неблагоприятных условиях существования (Фердман, 1966; Рубин, Ладыгина, 1966).

Интересные закономерности выявлены нами и при исследовании активности некоторых окислительных ферментов в прорастающих в условиях засоления семенах. Так, в них под влиянием засоляющих ионов Cl^- и SO_4^{2-} усиливается роль флавоновых оксидаз, которые берут на себя функцию основных завершающих оксидаз, тогда как такие ферменты, как цитохромоксидаза, полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза, снижают свою активность. Флавооксидазы более устойчивы к засолению в связи с тем, что ионы металлов их активного центра, по-видимому, экранированы от анионов Cl^- и SO_4^{2-} . В цитохромоксидазе, полифенолоксидазе и аскорбатоксидазе металл, входящий в их активную группу, вероятно, не защищен подобным образом, поэтому более быстро ингибируется соевыми ионами.

Интересно значение и то, где локализованы эти ферменты. В результате накопления солей в митохондриальном аппарате клеток может происходить нарушение структуры. Этим, возможно, и обуславливается торможение активности цитохромоксидазы и других металлосодержащих оксидаз, действие которых проявляется, в основном, в митохондриях. Флавоновые оксидазы, окислительно-восстановительный потенциал которых ниже, чем у металлосодержащих, проявляют свое действие, преимущественно, во внемитохондриальной зоне, в цитоплазме.

Усиление деятельности флавоновых оксидаз у проростков в условиях засоления коррелирует с отмеченным выше повышением в дыхании проростков удельного веса гексозомонофосфатного пути окисления, в котором флавоновые ферменты играют роль терминальных оксидаз. Способствуя укорочению дыхательной цепочки, флавооксидазы ускоряют высвобождение энергии. Однако при этом перенос электронов дыхательной цепи осуществляется по пути,

слабо сопряженному с фосфорилированием (Махлиз, 1960, Вербицкая, 1962; Скулачев, 1962, Zelitch, 1964), что понижает энергетическую эффективность дыхательного процесса.

Таким образом, можно заключить, что активность и направленность окислительного процесса у растений в условиях засоления в начальные фазы их жизни подвергается значительным изменениям. Последние находятся в прямой зависимости от особенностей их фосфорного обмена и чувствительности к засоляющим ионам ферментов, участвующих в дыхании и фосфорном обмене.

Существенной стороной изменения процесса дыхания у семян, прорастающих в условиях засоления, является переключение его на путь, экономящий трату дыхательного материала и ускоряющий высвобождение энергии. Последнее компенсирует недостаточность ее образования в таких неблагоприятных условиях существования растений, как засоление.

Основное содержание диссертации представлено в следующих работах:

1. И.Я.Горис, Г.Р.Матухин. Дыхание прорастающих семян в условиях засоления. Научные сообщения за 1964 год. Серия точных и естественных наук. РГУ. Ростов н/Д. 1965.
2. И.Я.Горис. Особенности фосфорного обмена растений в условиях засоления. Доклады на межвузовской научно-технической конференции аспирантов. Ростовский пединститут. Ростов н/Д. 1966.
3. И.Я.Горис. Фосфорный обмен у проростков на засолении. Доклады на I ростовской областной научно-теоретической конференции молодых ученых и специалистов. Секция естественных наук, т. II. Ростов н/Д. 1967.

4. И.Я.Горис. Влияние засоления на дыхание и активность терминальных оксидаз проростков ячменя и подсолнечника. Материалы 7-8-ой конференции аспирантов РГУ. Ростов н/Д. 1967.

5. И.Я.Горис, Г.Р.Матухин. О влиянии засоления на соотношение начальных путей дыхания в прорастающих семенах ячменя. (журнал "Сельскохозяйственная биология", в печати).

6. И.Я.Горис. Об активности терминальных оксидаз в семенах, прорастающих в условиях равнокачественного засоления. (журнал "Сельскохозяйственная биология", в печати).