

УДК 581.13:581.08.132

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ДЫХАНИЯ В ПРОРОСТКАХ ХЛОРОФИЛЛЬНОГО МУТАНТА ГОРОХА ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Г.С. ВЕРХОТУРОВА, О.Б. ВАЙШЛЯ, Г.В. БОРОВИКОВА, Т.П. АСТАФУРОВА

*Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
Томского государственного университета
634050 Томск, просп. Ленина, 36*

Изучали особенности дыхательного метаболизма у 8-суточных проростков хлорофилльного мутанта гороха М-2014 (*Pisum sativum* L.) к гипобарической гипоксии длительностью 6 и 12 ч. У мутантных растений в отличие от нормальных не наблюдается дозозависимой реакции метаболических процессов на разную длительность гипоксического воздействия. Их устойчивость к 6-часовой гипоксии обеспечивается исходно высокой интенсивностью дыхательного метаболизма. При нарастающей длительности стрессового фактора (12 ч) толерантность мутанта сохраняется вследствие высокой активности малик-энзима, дополнительной активации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, разнонаправленных изменений ферментативной активности изоцитрат- и малатдегидрогеназы. Одновременное повышение содержания малата в листьях мутантных растений стабилизирует рН клетки и снижает риск развития ацидоза.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., хлорофилльный мутант М-2014, гипобарическая гипоксия, дыхательный метаболизм.

Гипоксия как фактор анаэробного стресса и как метод изучения адаптационных механизмов у растений широко и успешно используется в экспериментальной биохимии, физиологии, молекулярной биологии [1–3, 8, 9].

Гипобарическая гипоксия является одной из разновидностей гипоксии, при которой кислородная недостаточность сопровождается одновременным понижением атмосферного давления. Многофакторность ее стрессового воздействия на процессы жизнедеятельности растений представляет особый интерес не только как фундаментальная проблема физиологии растений, но и в связи с освоением человеком высокогорных районов, развитием космических исследований, созданием искусственных систем жизнеобеспечения и решением экологических задач, связанных с формированием климата. Исследований, посвященных изучению воздействия гипобарической гипоксии на рост и развитие растений, недостаточно [1, 2, 18], что, по-видимому, обусловлено определенными методическими трудностями. Тем не менее экспериментально установлено, что в условиях разреженной атмосферы метаболические взаимоотношения фотосинтеза и дыхания носят компенсаторный характер и связаны с усилением определенных анаэробных реакций [2, 12]. Что касается ферментов дыхательного метаболизма в зеленых листьях гороха в условиях пониженного атмосферного давления на свету, то для них также установлены адаптивные изменения их активности [1].

Реакции темнового дыхательного метаболизма в ассимилирующих органах и механизмы взаимодействия фотосинтеза и дыхания можно изучать на различных оригинальных моделях, в частности на хлорофилльных мутантах [7, 12].

Целью нашей работы было выяснение особенностей функционирования метаболических этапов дыхания у мутантных растений гороха, характеризующихся генетически обусловленной недостаточностью фотосинтетической активности, на воздействие гипобарической гипоксии длительностью 6 и 12 ч.

Методика

Объектом исследования служили 8-суточные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг и его хлорофилльного мутанта М-2014 из коллекции К.К. Сидоровой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Растения выращивали в условиях почвенной культуры при температуре воздуха 22–24 °С и освещении люминесцентными лампами интенсивностью 40 Вт/м² ФАР с 12-часовым фотопериодом.

Подготовленные для эксперимента проростки гороха разделяли на две группы, состоящие из нормальных и мутантных растений. Одну группу помещали в экспозиционные камеры, в которых поддерживали естественные условия аэрации, нормальное барометрическое давление и освещение интенсивностью 30 Вт/м² (контроль). Другую группу растений помещали в термобарокамеру ТГ-50.4. VEB фирмы «Hochvakuum» (Германия), где при такой же интенсивности света создавали условия пониженного барометрического и парциального давления газов, отличавшегося от контроля в 20 раз (гипобарическая гипоксия). Степень разрежения воздуха контролировали по показаниям дифманометра ДТ-50 и высотомера. Парциальное давление кислорода при разрежении воздуха соответствовало интервалу от 11 до 2 кПа. Скорость откачивания воздуха и его впуска составляла 16 м/с.

Источником освещения служили лампы ЛДЦ-40, смонтированные непосредственно в экспериментальном отсеке барокамеры. Интенсивность света измеряли пиранометром Янишевского, термоток которого регистрировали гальванометром переносного типа М-195. Длительность экспозиции света и гипобарической гипоксии составляла 6 и 12 ч.

Влажность почвы контролировали гравиметрическим методом, температуру и относительную влажность воздуха измеряли стандартным термоспирометром. При длительных экспозициях в камеру помещали открытые сосуды с водой и приемники с аскаритом или 20 %-м раствором КОН для поглощения СО₂.

Функционирование окислительного пентозофосфатного цикла (ОПФЦ) оценивали по активности ключевого фермента — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (НАДФ-Г-6-ФДГ), интенсивность цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) — по активности малатдегидрогеназы (НАД-МДГ) и изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИДГ), функциональную активность выполняющих механизмов — по активности малик-энзима (НАДФ-МЭ). Активность ферментов определяли спектрофотометрически по стандартным методикам, модифицированным применительно к объектам исследования [4]. Количество пирувата [15], малата и лактата [17] в листьях проростков гороха определяли энзиматически. Содержание белка изме-

ряли по Бредфорд [13]. Результаты выражали в единицах ферментативной активности на 1 мг белка.

В работе использовали реактивы «Serva» (Германия), «Sigma» (США) и минеральные соли (х.ч.) отечественного производства.

Проведено от 3 до 5 серий аналогичных опытов в двух-трехкратной биологической повторности. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента [5]. Достоверными приняты различия по величине p , не превышающие 0,05.

Результаты и обсуждение

В опытах использованы проростки мутантных растений гороха М-2014, листья которых из-за пониженного содержания зеленых пигментов имели салатный оттенок. Среди ограничений фотосинтетической активности у мутантных растений, с одной стороны, установлены замедленная скорость циклического фотофосфорилирования и высокая активность темновой фазы фиксации CO_2 [1], с другой — стабильно высокий уровень активности дыхательных ферментов [2].

Действительно, активность НАДФ-Г-6-ФДГ у мутантных растений была более чем в 3 раза выше, а активность НАД-ИДГ и НАД-МДГ — соответственно в 1,5 и 2,5 раза ниже, чем у нормальных растений (табл. 1). Эти данные свидетельствуют об исходно высокой интенсивности ОПФЦ и недостаточной функциональной активности ЦТК у мутантных растений.

У нормальных растений гороха в условиях гипобарической гипоксии на 80 % (6 ч) повышалась активность НАДФ-Г-6-ФДГ, резко ингибировалась активность НАД-ИДГ и НАД-МДГ — соответственно в 2,5 и 2 раза. Пребывание растений в разреженной атмосфере в течение 12 ч вызывало дополнительное значительное повышение (на 190 %) активности НАДФ-Г-6-ФДГ, что сопровождалось восстановлением активности ферментов ЦТК, более заметным для МДГ (см. табл. 1), повышением активности малик-энзима (в 2 раза) (табл. 2), концентрации пирувата, лактата (в 4 раза) и малата (в 3,2 раза) (табл. 3).

У проростков хлорофильных мутантов, обладающих значительно более высоким уровнем активности Г-6-ФДГ по сравнению с нормальными растениями, при 6-часовой гипоксии не наблюдается ни дополнительной активации фермента и интенсификации ОПФЦ, ни изменений активности ферментов ИДГ и МДГ. При 12-часовой гипоксии на 85 % повышается активность ключевого фермента ОПФЦ (см. табл. 1). Небольшое, хотя и достоверное повышение активности МДГ (на 20 %) не сопровождается изменениями активностей ИДГ, малик-фермента (см. табл. 1, 2), а также концентраций лактата и пирувата в цитоплазме клетки (см. табл. 3). Содержание малата увеличивается в 1,8 раза по сравнению с контрольными мутантными растениями.

Таким образом, дозированное воздействие гипобарической гипоксии выявляет интересные особенности приспособительных реакций темного дыхания на свету у нормальных и мутантных растений.

У нормальных растений наблюдается четко выраженная зависимость изменений активности ферментов от длительности (6 и 12 ч) воздействия гипобарической гипоксии: дозозависимая реакция ОПФЦ, резкое ингибирование ЦТК (6 ч) с последующим его восстановлением (12 ч), т.е. эти растения имеют лабильный метаболический аппарат, позволяющий им активно приспосабливаться к изменяющимся условиям среды.

ТАБЛИЦА 1. Влияние гипобарической гипоксии ($P \approx 8$ кПа, $P_{O_2} \approx 2$ кПа) на активность ферментов в листьях нормальных и мутантных растений гороха при интенсивности освещения 30 Вт/м²

Вариант опыта	Длительность экспозиции, ч	Активность, мЕ/мг белка
НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа		
Нормальные растения		
Контроль	6	15,5 ± 0,9
Гипоксия	6	27,9 ± 1,0; $p < 0,001$
Контроль	12	17,4 ± 0,8
Гипоксия	12	52,2 ± 1,9; $p < 0,001$
Мутантные растения		
Контроль	6	55,8 ± 3,2
Гипоксия	6	61,3 ± 3,0
Контроль	12	48,4 ± 2,8
Гипоксия	12	89,5 ± 4,5; $p < 0,001$
НАД-изоцитратдегидрогеназа		
Нормальные растения		
Контроль	6	14,3 ± 1,0
Гипоксия	6	5,6 ± 0,4; $p < 0,001$
Контроль	12	14,8 ± 1,0
Гипоксия	12	8,9 ± 0,6; $p < 0,001$
Мутантные растения		
Контроль	6	9,0 ± 0,6
Гипоксия	6	7,8 ± 0,5; $p > 0,05$
Контроль	12	10,1 ± 0,8
Гипоксия	12	10,6 ± 0,8; $p > 0,05$
НАД-малатдегидрогеназа		
Нормальные растения		
Контроль	6	190,3 ± 11
Гипоксия	6	81,8 ± 3,8; $p < 0,001$
Контроль	12	230,4 ± 13
Гипоксия	12	260,3 ± 0,6
Мутантные растения		
Контроль	6	76,1 ± 4,6
Гипоксия	6	80,4 ± 4,3
Контроль	12	71,5 ± 4,6
Гипоксия	12	95,8 ± 5,1; $p < 0,001$

У мутантных растений, характеризующихся высокой активностью ферментов ОПФЦ и невысокой активностью ферментов цикла Кребса, дозозависимая реакция на гипоксическое воздействие разной длительности не наблюдается (см. табл. 3).

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ДЫХАНИЯ

ТАБЛИЦА 2. Влияние 12-часовой гипобарической гипоксии ($P \approx 8$ кПа, $P_{O_2} \approx 2$ кПа) на активность НАДФ-малик-энзима в листьях нормальных и мутантных растений гороха при интенсивности освещения 30 Вт/м^2

Вариант опыта	Активность, мЕ/мг белка
Нормальные растения	
Контроль	$8,8 \pm 0,3$
Гипоксия	$16,7 \pm 0,6$; $p < 0,001$
Мутантные растения	
Контроль	$30,8 \pm 1,1$
Гипоксия	$28,9 \pm 1,0$; $p > 0,05$

ТАБЛИЦА 3. Влияние гипобарической гипоксии ($P \approx 8$ кПа, $P_{O_2} \approx 2$ кПа) на содержание органических кислот (мкмоль/г сырого вещества) в листьях нормальных и мутантных растений гороха при интенсивности освещения 30 Вт/м^2 ; время экспозиции 12 ч

Вариант опыта	Пируват	Лактат	Малат
Нормальные растения			
Контроль	$2,07 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,06$
Гипоксия	$3,10 \pm 0,12$ $p < 0,001$	$3,68 \pm 0,16$ $p < 0,001$	$4,38 \pm 0,02$ $p < 0,001$
Мутантные растения			
Контроль	$1,63 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,09$	$2,15 \pm 0,08$
Гипоксия	$1,97 \pm 0,09$ $p > 0,05$	$1,65 \pm 0,07$ $p > 0,05$	$3,87 \pm 0,13$ $p < 0,001$

С одной стороны, отсутствие четко выраженной адаптивной реакции ферментов цикла Кребса у мутантных растений свидетельствует, по-видимому, о том, что дальнейшее снижение активности этого метаболического цикла находится на пределе их адаптации к условиям разреженной атмосферы, с другой — высокая активность ключевого фермента ОПФЦ в листьях мутантных растений и его способность к дальнейшей активации при нарастании продолжительности действия фактора является не только защитной реакцией, но и одним из определяющих (наряду с малик-энзимом) механизмов адаптации мутантных растений к гипоксии. До сих пор не известно, разделены ли пространственно реакции гликолиза и пентозофосфатного пути в цитоплазме клетки, но роль последнего как источника НАДФН для биосинтеза жирных кислот, восстановительного карбоксилирования пирувата и других метаболитов несомненна.

Судя по активности ферментов начального и заключительного этапов цикла Кребса, и у нормальных, и у мутантных растений циклические превращения ди- и трикарбоновых кислот при недостатке кислорода могут многократно повторяться, а при необходимости образующиеся интермедиаты могут использоваться в биосинтезах. Доказанное ранее в условиях гипоксии повышение содержания глутамата [1, 2] и, вероятно, аминокислот семейства глутамата можно рассматривать как адаптивную реакцию в ответ на ацидоз цитоплазмы в условиях аноксии [10, 11, 14]. Это означает, что функционирование при гипоксии ЦТК в некотором

объеме, а затем его усиление обеспечивает устойчивость нормальных и мутантных растений к дефициту кислорода.

Известно, что удаление отдельных кислот из цикла должно возмещаться повышением активности фосфопируваткарбоксилазы и малик-энзима [6]. При сравнении толерантности малик-фермента в проростках нормальных и мутантных растений к световой экспозиции в течение 12 ч обнаружено, что мутантная форма гороха отличалась значительно более высокой активностью малик-фермента, которая превышала ее уровень у нормальных растений в 3,5 раза. По-видимому, именно поэтому стрессовое воздействие в течение 12 ч не вызывает в листьях мутантных проростков дополнительных изменений активности малик-фермента; напротив, у нормальных растений она повышается в 1,9 раза, но не достигает уровня у мутантных растений (см. табл. 2). Все это свидетельствует о том, что при недостаточной интенсивности процессов фотосинтеза у хлорофилльного мутанта усиливаются восполняющие реакции, в частности работа НАДФ-малик-энзима, вырабатывающего пируват и диоксид углерода.

Анализ продуктов обмена, образующихся на ключевых этапах дыхательного метаболизма, показал, что их содержание тесно связано с изменением ферментативной активности у нормальных и мутантных растений. В листьях проростков нормальных растений после 12-часовой гипоксии увеличивается концентрация органических кислот, наиболее значительно для лактата и малата, содержание которых превышает контрольный уровень соответственно в 4 и 3,2 раза. У хлорофилльных мутантных растений при той же длительности гипоксического стресса содержание пирувата и лактата не изменяется, но заметно (в 1,8 раза) возрастает количество яблочной кислоты (см. табл. 3).

Известно, что уровень лактата у нормальных растений поддерживается невысоким, но в условиях 12-часовой гипоксии наблюдаемое значительное повышение его концентрации, по-видимому, не приводит к закислению цитоплазмы, которое может компенсироваться одновременным увеличением содержания пирувата и малата (см. табл. 3). Активно синтезирующийся малат повышает устойчивость растений к действию стресс-фактора, так как не только способствует возобновлению цикла Кребса, но и является субстратом для малик-энзима, участвует в образовании оксалоацетата, в челночных механизмах переноса восстановительных эквивалентов и в других процессах. Повышение в листьях нормальных растений содержания пирувата в условиях низкого парциального давления не только кислорода, но и диоксида углерода способствует преобладанию окислительного декарбоксилирования пирувата с образованием ацетил-КоА [6].

В листьях мутантных растений в условиях гипоксии, наоборот, лактат не накапливается. Повышенное содержание малата свидетельствует о том, что у М-2014 возможна активация пируватдекарбоксилазы, катализирующей переключение реакций с лактатного на этанольное брожение [6], а такое течение процессов не вызывает закисления цитоплазмы, стабилизирует рН клеток, что можно рассматривать как приспособительную реакцию мутантных растений к гипоксии [16].

Таким образом, устойчивость мутантных растений к 6-часовой гипоксии обеспечивается исходно высокой интенсивностью дыхательного метаболизма. При нарастающей длительности стрессового фактора (12 ч) на фоне высокой активности малик-энзима наблюдаются допол-

нительная активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, разнонаправленность адаптации ферментов ЦТК, увеличивается концентрация малата. Это способствует формированию большей биохимической толерантности мутантных растений к действию гипобарической гипоксии.

1. Астафурова Т.П., Вайшла О.Б., Зайцева Т.А. и др. Особенности дыхательного метаболизма в листьях гороха при гипобарической гипоксии // Физиология растений. — 1993. — **40**, вып. 4. — С. 656—661.
2. Астафурова Т.П. Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания при адаптации растений к условиям гипобарической гипоксии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Томск, 1997. — 42 с.
3. Варпанетян Б.Б. Учение о гипоксическом и аноксическом стрессах растений — новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений // Вестн. НААВ. — 2007. — № 5 (55, сентябрь—октябрь), 2007.
4. Верхотурова Г.С., Астафурова Т.П. О направлении реакций цикла Кребса в зеленых листьях на свету // Физиология растений. — 1983. — **30**, вып. 3. — С. 380—386.
5. Кузнецов В.К. Ускоренный метод статистической обработки результатов наблюдений при сравнении средних // Социально-гигиенические исследования: Тр. II Моск. мед. ин-та, 1973. — **19**, № 3. — С. 253.
6. Либберт Э. Физиология растений. — М.: Мир, 1976. — С. 232.
7. Соколов В.А., Шумный В.К., Горбунова Г.В., Сушкова О.В. Сравнительное изучение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в онтогенезе у линий и гибридов гороха в связи с гетерозисом // Генетика. — 1983. — **19**, № 12. — С. 2069—2072.
8. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1988. — 244 с.
9. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. — СПб.: Изд-во Санкт-Петерб. ун-та, 2002. — 240 с.
10. Armstrong W., Brandle R., Jackson M.B. Mechanisms of flood tolerance in plants // Acta Bot. Neerl. — 1994. — **43**. — P. 307—358.
11. Arpagaus S., Brandle R. The significance of α -amylase under anoxia stress in tolerant rhizomes (*Acorus calamus* L.) and nontolerant tubers (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) // J. Exp. Bot. — 2000. — **51**. — P. 1475—1477.
12. Astafurova T.P., Ponomarev Yu.N., Ageev B.G. et al. Dynamics of CO₂ evolution by plants at low pressure // Biol. Plant. — 1996. — **38**, N 2. — P. 215—221.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
14. Crawford R.M.M., Brandle R. Oxygen deprivation stress in a changing environment // J. Exp. Bot. — 1996. — **47**. — P. 145—159.
15. Csok R., Lamprecht W. Bestimmung der Pyruvate Sdure // Methoden der enzymatischen Analyse. — Berlin, 1970. — **2**. — S. 1407—1411.
16. Fox G.G., McCallan N.R., Ratcliff R.G. Manipulating cytoplasmic pH under anoxia: A critical test of the role of pH in the switch from aerobic to anaerobic metabolism // Plant. — 1995. — **195**. — P. 324—330.
17. Hohorst H.I. Bestimmung der Malate Sdure // Methoden der enzymatischen Analyse. — Berlin, 1970. — **2**. — S. 1425—1429.
18. Musgrave M.E., Scheld H.W., Strain B.R. Physiological response of crop plants to non-earth-normal metabolic gas ratios and pressures // Proceedings of the American Society for Gravitational and Space Biol. — Charlottesville: VA, 1986. — P. 16.

Получено 05.11.2008

ФУНКЦІОНУВАННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ЕТАПІВ ДИХАННЯ В ПРОРОСТКАХ ХЛОРОФІЛЬНОГО МУТАНТА ГОРОХУ ЗА ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ

Г.С. Верхотурова, О.Б. Вайшла, Г.В. Боровикова, Т.П. Астафурова

Науково-дослідний інститут біології і біофізики Томського державного університету

Вивчали особливості дихального метаболізму у 8-добових проростків хлорофільного мутанта гороху М-2014 (*Pisum sativum* L.) до гіпобаричної гіпоксії тривалістю 6 і 12 год. У му-

тантних рослин на відміну від нормальних не спостерігали дозозалежної реакції метаболічних процесів на гіпоксичну дію різної тривалості. Їх стійкість до 6-годинної гіпоксії забезпечується первинно високою інтенсивністю дихального метаболізму. За наростання тривалості стресового чинника (12 год) толерантність мутанта зберігається внаслідок високої активності малік-ензиму, додаткової активації глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, різноспрямованих змін ферментативної активності ізоцитрат- і малатдегідрогенази. Одночасне підвищення вмісту малату в листках мутантних рослин стабілізує рН клітини і знижує ризик розвитку ацидозу.

FUNCTIONING OF METABOLIC STAGES OF RESPIRATION IN SEEDLINGS OF THE CHLOROPHYLLOUS MUTANT OF PEA UNDER HYPOBARIC HYPOXIA

G.S. Verkhoturova, O.B. Vajshlya, G.V. Borovikova, T.P. Astafurova

Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University
36 pr. Lenin, Tomsk, 634050, Russia

The peculiarities of the respiration metabolism in 8-days seedlings of chlorophyllous mutant of pea M-2014 (*Pisum sativum* L., cv. Torsdag) to hypobaric hypoxia 6 and 12 h duration were studied. In mutant plants unlike normal ones, the dose dependent reaction of studying metabolic processes under hypoxia was not observed. Their tolerance to 6-hours hypoxia was provided by initially high activity of respiration processes. With the increasing of stress duration (12 h) the tolerance of mutant plants was preserved by high activity of malic-enzyme, additional activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, and different changes of izocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activity. The simultaneous increase of the malate content in leaves of mutant plants stabilizes pH of cell and decreases the risk of acidosis development.

Key words: *Pisum sativum* L., chlorophyllous mutant M-2014, hypobaric hypoxia, respiration metabolism.