

фону фосфорно-калийных удобрений, так и по всем трем испытываемым дозам минерального азота.

В посевах клевера установлено, что на фоне фосфорно-калийных удобрений лишь малая доза азота (30 кг/га) не снижает эффективность искусственной инокуляции.

В опытах с люцерной показано, что наиболее высокие урожаи зеленой массы были получены при совместном использовании ризоторфина и минерального азота в количестве 30 и 60 кг/га. Повышение дозы минерального азота до 90 кг/га снижает эффективность бобово-ризобияльного симбиоза.

Литература

1. Кожемяков А.П. Продуктивность азотфиксации в агроценозах // Микробиологический журнал. 1977. Т. 59. № 4.
2. Патыка В.Ф., Калинин А.В., Колмаз Ю.Т., Кислухина М.В. Роль азотфиксирующих микроорганизмов в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений // Там же.
3. Гнетиева Л.Н., Барышникова Л.М. Влияние нитрагина и минерального азота на уровень симбиотической азотфиксации, урожай белой кормовой люпина и кормовых бобов и его качество // Тр. Всесоюз. науч.-исслед. ин-та с.-х. микробиологии. Т. 57. Л., 1987.
4. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л., 1970.
5. Мильто Н.И. Клубеньковые бактерии и продуктивность бобовых растений. Минск, 1982.
6. Гукова М.М. Особенности питания бобовых растений свободным и связанным азотом: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1974.
7. Алисова С.М. и др. Влияние минерального азота на ацетилен восстанавливающую активность клубеньков гороха // Тр. Всесоюз. науч.-исслед. ин-та с.-х. микробиологии. Т. 47. Л., 1987.
8. Лупашку З.А. Усвоение минерального и биологического азота соей при инокуляции // Микроорганизмы и продуктивность сельского хозяйства. Рига, 1980.
9. Посыпанов Г.С. Азотфиксация бобовых культур в зависимости от почвенно-климатических условий // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М., 1985.
10. Трепачёв Е.П. Значение биологического и минерального азота в проблеме белка // Там же.
11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1985.

УДК 581.19

С.А. Войцеконская, Т.П. Астафурова**, Б.Г. Агеев***, В.А. Сапожникова****

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ РАСТЕНИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ

*Томский государственный педагогический университет

**Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета

***Институт оптики атмосферы СО РАН

Адаптация растений к условиям гипоксии осуществляется на морфологическом, клеточном, биохимическом, генетическом уровнях. У одних растений, постоянно находящихся в условиях дефицита кислорода, в процессе эволюции выработались разнообразные приспособления (устойчивые объекты), у других они возникают во время воздействия неблагоприятного фактора или не появляются совсем (неустойчивые объекты). Исследование механизмов адаптации растений к условиям анаэробно-гипоксического состояния представляет интерес в связи с изучением основ устойчивости. Это имеет большое практическое значение для разработки способов выращивания растений на затопляемых территориях, создания тестовых систем для селекционного отбора устойчивых к дефициту кислорода сельскохозяйственных культур. Актуальность исследований в этой области возрастает в связи с освоением высокогорных районов, Космоса, морских глубин и решением различных экологических задач. Экспериментально гипоксические условия создают затоплением, вы-

теснением воздуха инертными газами, разряжением атмосферы (гипобарическая гипоксия), причем последний способ менее изучен.

Целью настоящей работы являлось изучение биохимических механизмов адаптации к гипобарической гипоксии растений, контрастных по устойчивости к этому фактору. В задачи работы входило: 1) определение активности ключевого фермента анаэробного обмена – алкогольдегидрогеназы (АДГ) в различных условиях аэрации; 2) исследование влияния гипобарической гипоксии на активность малатдегидрогеназ: НАД-зависимой малатдегидрогеназы (НАД-МДГ) и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (НАДН-МДГ).

Объектами служили 7-суточные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Тулунская и 10-суточные проростки риса (*Oryza sativa* L.) сорта ВНИИР-17, различающиеся по устойчивости к дефициту кислорода. Растения выращивали на специальных подставках на дистиллированной воде при температуре воз-

духа 22–24 °С под люминесцентными лампами интенсивностью 40 Вт/м² с 12-часовым фотопериодом. Гипоксические условия достигались помещением растений в барокамеры с пониженным парциальным давлением кислорода (2 кПа) на 1 и 3 сут. Для исключения фотосинтеза растения находились в темноте. Контрольные проростки выдерживали такое же количество времени при нормальной аэрации и атмосферном давлении в темноте. После завершения эксперимента растительный материал сразу же использовался для анализа. Количественное определение белка осуществляли по методу Бредфорда, активность ферментов дегидрогеназ определяли спектрофотометрически [1]. Результаты обрабатывали статистически, рассчитывали среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий между контролем и опытом оценивали, используя критерий Стьюдента, при 5 %-ном уровне значимости [2].

Перестройка окислительного метаболизма в растениях на анаэробный путь обмена, определяющий адаптацию организма, связана с активацией ключевых ферментов гликолиза и брожения, а также снижением энзиматической активности цикла Кребса и включением альтернативных путей [3, 4]. Особый интерес представляет фермент заключительного этапа спиртового брожения, которое активируется при недостатке кислорода в растениях – АДГ. Исследования, проведенные с проростками пшеницы и риса, выращенными в нормальных условиях аэрации, показали, что активность АДГ по окислению этанола в корнях пшеницы от 1 к трем суткам пребывания в темноте увеличилась, в то время как в листьях уменьшилась (табл. 1). В отличие от пшеницы, для риса отмечена тенденция

к постепенному увеличению активности фермента с течением времени как в корнях, так и в листьях. В гипоксических условиях активность АДГ в проростках пшеницы снижалась по сравнению с аэрируемым контролем. Так, после суточной гипоксии в корнях она составила 83 % от контроля, а при увеличении срока экспозиции до трех суток – лишь 59 %. Влияние гипобарической гипоксии на активность АДГ в зеленой части проростков было более значительным. После суточного воздействия этот показатель снизился до 14 % по сравнению с контрольным вариантом, а при увеличении срока неблагоприятного действия фактора до трех суток составил 30 % от контроля. При анаэробно-брожении в проростках риса, более приспособленного растения, наблюдалось резкое увеличение активности заключительного энзима спиртового брожения. В корнях уже после суточной гипоксии она была выше, чем в соответствующем контроле, в 1.4 раза. А при увеличении срока до трех суток активность АДГ составила 344 % от аэрируемого контроля. Подобная активизация работы фермента при анаэробно-брожении наблюдалась и в листьях устойчивого растения. Если после суточного пребывания в барокамере в листьях риса активность АДГ составила 130 % от контроля, то после трех суток – 429 %.

Таким образом, в анаэробных условиях с течением времени в проростках неустойчивого растения наблюдалось снижение активности основного фермента анаэробного обмена, в то время как для устойчивого объекта характерно постепенное увеличение интенсивности его работы. Это связано, вероятно, с высоким уровнем протекания процессов гликолиза и брожения при гипоксии у приспособленных растений, которые обеспечивают при невозможности окислительного фосфорилирования высокий энергетический потенциал. Считают, что избыточно высокая ферментативная активность, наблюдаемая у устойчивых к гипоксии объектов, необходима при переходе от низкой интенсивности гликолиза к высокой, когда этот переход должен происходить быстро и без изменения концентрации метаболитов [5]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у риса, в отличие от пшеницы, анаэробно-брожение индуцирует обращение конечных этапов брожения, как это было показано ранее [3]. У неустойчивых объектов было обнаружено более интенсивное накопление этанола в бескислородной среде по сравнению с устойчивыми. Сдвиг алкогольдегидрогеназной реакции в сторону окисления этанола после анаэробного воздействия у приспособленных растений препятствует накоплению конечных продуктов брожения, что способствует длительному поддержанию нормального уровня кислотности в клетке.

Для поддержания высокой скорости анаэробного гликолиза при недостатке кислорода необходимо непрерывное реокисление восстанавливающихся в ходе его коферментов. Если у многих устойчивых растений действительно возможно обращение конечных

Таблица 1
Влияние гипобарической гипоксии на активность ключевого фермента анаэробного обмена – АДГ в проростках пшеницы и риса

Исследуемый материал	Условие опыта/сут	Активность фермента		
		МЕ × мг белка ⁻¹	%	
Пшеница	корни	Аэрация/1	0.24 ± 0.02	100
		Гипоксия/1	0.20 ± 0.02	83
		Аэрация/3	1.03 ± 0.01	100
		Гипоксия/3	0.61 ± 0.05	59
	листья	Аэрация/1	0.83 ± 0.07	100
		Гипоксия/1	0.12 ± 0.01	14
		Аэрация/3	0.33 ± 0.02	100
		Гипоксия/3	0.10 ± 0.01	30
Рис	корни	Аэрация/1	0.14 ± 0.01	100
		Гипоксия/1	0.20 ± 0.01	143
		Аэрация/3	0.24 ± 0.02	100
		Гипоксия/3	0.83 ± 0.07	344
	листья	Аэрация/1	0.07 ± 0.01	100
		Гипоксия/1	0.09 ± 0.09	130
		Аэрация/3	0.40 ± 0.06	100
		Гипоксия/3	1.71 ± 0.20	426

Таблица 2

Активность малатдегидрогеназ в проростках пшеницы и риса в различных условиях аэрации

Исследуемый материал	Условие опыта/сут	НАД-МДГ		НАДН-МДГ		
		МЕ × мг белка ⁻¹	%	МЕ × мг белка ⁻¹	%	
Пшеница	корни	Аэрация/1	10.0 ± 0.80	100	5.0 ± 0.4	100
		Гипоксия/1	8.0 ± 0.5	80	3.0 ± 0.1	60
		Аэрация/3	23.0 ± 1.0	100	3.0 ± 0.2	100
		Гипоксия/3	11.5 ± 0.9	50	5.0 ± 0.3	167
	листья	Аэрация/1	18.0 ± 0.7	100	3.7 ± 0.3	100
		Гипоксия/1	12.5 ± 0.5	69	1.7 ± 0.2	46
		Аэрация/3	29.0 ± 0.9	100	3.0 ± 0.2	100
		Гипоксия/3	9.5 ± 0.7	33	1.8 ± 0.1	60
Рис	корни	Аэрация/1	16.5 ± 1.2	100	5.0 ± 0.3	100
		Гипоксия/1	9.5 ± 0.8	58	8.0 ± 0.5	160
		Аэрация/3	23.0 ± 2.0	100	8.0 ± 0.5	100
		Гипоксия/3	7.0 ± 0.5	30	20.0 ± 0.7	250
	листья	Аэрация/1	13.5 ± 1.0	100	9.0 ± 0.8	100
		Гипоксия/1	11.0 ± 1.1	81	18.5 ± 0.9	205
		Аэрация/3	26.5 ± 2.1	100	7.0 ± 0.5	100
		Гипоксия/3	10.2 ± 0.8	38	28.5 ± 1.2	407

реакций спиртового брожения без торможения гликолиза, то должны существовать дополнительные пути, выполняющие задачу реокисления восстановленных коферментов. Одним из способов трансформации дыхания при анаэробнозе у устойчивых объектов является обращение дикарбоновой части цикла Кребса. Исследовали влияние гипобарической гипоксии на активность дегидрогеназ, регулирующих протекание заключительной реакции цикла трикарбоновых кислот: НАД-МДГ и НАДН-МДГ. Первый фермент катализирует окисление яблочной кислоты в щавелево-уксусную, второй ускоряет обратную реакцию восстановления оксалоацетата в малат.

В условиях нормальной аэрации активность НАД-МДГ возрастала от одних к трем суткам в проростках пшеницы и риса (табл. 2). В темноте активно функционирует цикл Кребса для обеспечения растительного организма энергией и необходимыми метаболитами. По мере увеличения срока гипобарического воздействия активность НАД-МДГ снижалась и в листьях, и в корнях обоих растений. НАДН-МДГ в контрольных вариантах при нормальной аэрации в темноте работала слабо и в корнях, и в листьях пшеницы и риса. Различия между устойчивым и неустойчивым объектом обнаружались в анаэробных ус-

ловиях. В листьях пшеницы уровень активности этого фермента и при суточном, и при 3-суточном анаэробнозе был ниже, чем в соответствующем контроле. Длительное пребывание в условиях кислородной недостаточности приводило к усилению работы НАДН-МДГ в корнях пшеницы. В проростках более приспособленного к недостатку кислорода риса отмечалось увеличение активности этого фермента и в корнях, и в листьях уже после кратковременной гипоксии (1 сут). Трехсуточное пребывание растений в барокамере вызывало повышение активности дегидрогеназы более чем в 2 раза по сравнению с аэрируемым контролем. Вероятно, это свидетельствует о смещении равновесия в реакции малат-оксалоацетат в сторону образования яблочной кислоты в анаэробных условиях у риса, что не исключает возможности обращения дикарбоновой части цикла ди- и трикарбоновых кислот у устойчивого к гипоксии объекта. Этот путь дополняет гликолиз, переходящий в брожение, осуществляя окисление НАДН и образование нетоксичных интермедиатов. Таким образом, изменение активности ряда ферментов в условиях анаэробноза у устойчивых растений обеспечивает необходимые перестройки обмена веществ с целью адаптации к изменившимся условиям среды.

Литература

1. Астафурова Т.П., Войцекская С.А., Верхотурова Г.С. и др. Специальный практикум по физиологии и биохимии растений. Томск, 2001. Вып. 4.
2. Кузнецов В.К. Методика ускоренного исчисления стандартного отклонения и ошибки средней // Социально-гигиенические исследования. М., 1970.
3. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. Л., 1988.
4. Астафурова Т.П., Верхотурова Г.С., Зайцева Т.А., Войцекская С.А. Особенности метаболизма в листьях растений на свету в условиях гипобарической гипоксии // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях. Томск, 2001.
5. Betts G.F., Srivastava D.K. The rationalization of high enzyme concentration in metabolic pathways such as glycolysis // J. Theor. Biol. 1991. V. 151.