

А. Т. Мокронос, Г. Ф. Некрасова

ЗАВИСИМОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНОЙ ФИКСАЦИИ CO₂ ЛИСТЬЯМИ КАРТОФЕЛЯ ОТ КИСЛОРОДА

Листья высших растений фиксируют CO₂ в темноте со скоростью 0,05—0,5 мг CO₂ на дм² за час. Темновая (гетеротрофная) фиксация CO₂ особенно характерна для суккулентов и раньше была изучена на растениях этой жизненной формы (Saltman, Kunitake, Spolter, 1957). Оказалось, однако, что все растения мезофитного типа также фиксируют CO₂ в темноте и принципиально не отличаются по этой функции от суккулентных растений.

Исследование биохимии гетеротрофной фиксации углекислоты показало, что этот процесс локализован в цитоплазме и заключается в карбоксилировании ФЭП (фосфоэнолпировиноградной кислоты) при участии ФЭП-карбоксилазы (Kluge, Kriebitzsch, Willert, 1974). Поскольку первыми устойчивыми C₄-продуктами у разных растений оказываются яблочная и аспарагиновая кислоты, то необходимыми компонентами гетеротрофной фиксации следует считать также НАДН-малатдегидрогеназу и аминотрансферазу.

Кроме того, необходимость генерации ФЭП требует присутствия в цитоплазме пируваткиназы. При длительной гетеротрофной фиксации, например на протяжении ночи, 4-углеродные кислоты накапливаются в вакуолях и к утру вакуолярные фонды этих соединений, как правило, очень велики, особенно у суккулентов. Из этого следует, что акцептор CO₂-ФЭП при длительной гетеротрофной фиксации не регенерируется, а должен вновь образовываться. Источником ФЭП в этом случае может быть только гликолиз. Этим гетеротрофная фиксация отличается от карбоксилирования ФЭП на свету, когда C₄-кислоты передают CO₂ на РидФ-карбоксилазу, например при участии пируваткиназы или фото-зависимой пируваткиназы. Таким образом, на свету карбоксилирование ФЭП и декарбоксилирование 4-углеродных кислот могут у некоторых объектов выполнять функцию челночного переноса CO₂ из среды через цитоплазму на РидФ-карбоксилазу хлоропласта.

По-видимому, такой механизм характерен не только для растений с двумя типами кооперирующих хлоропластов, у которых в

структуре листа содержатся бесхлорофильные клетки водоносной паренхимы.

Гетеротрофная фиксация была исследована нами ранее на листьях картофеля (Мокроносов, Михайлова, 1962) и было показано, что органические кислоты, накопившиеся в листьях на протяжении ночи, в последующий светлый период суток включаются в метаболизм, связанный, главным образом, с новообразованием кислот цикла Кребса и аминокислот. Значительная часть продуктов гетеротрофной фиксации окисляется в процессе дыхания.

Было показано, что продукты гетеротрофной фиксации в листьях картофеля не используются для синтеза углеводов, как это характерно для суккулентов. Обнаружен активный флоэмный транспорт окси- и кетокислот, образуемых при гетеротрофной фиксации (Мокроносов, Пономарева, Логвина, 1963).

Продолжая исследования по гетеротрофной фиксации CO_2 у картофеля, Михайлова (1968) изучала зависимость гетеротрофной фиксации от концентрации O_2 и обнаружила, что независимо от возраста и условий предшествующего освещения интенсивность темновой фиксации в 2—3 раза больше у листьев, выдержанных в бескислородной среде. Усиление гетеротрофной фиксации после анаэробноза осуществлялось за счет усиления синтеза яблочной кислоты, а также цитрата и глутамата.

Было высказано предположение, что усиление гетеротрофной фиксации предшествующим анаэробнозом определяется накоплением 3-углеродных акцепторов, поскольку при анаэробнозе не включается анаэробная фаза дыхания, но задерживается окисление пирувата в цикле Кребса. Михайлова показала также, что гетеротрофная фиксация усиливается предшествующим анаэробнозом после выдерживания листьев как на свету, так и в темноте, из чего следует, что гликолиз функционирует в листьях независимо от освещения.

Полученные Михайловой факты представляют несомненный интерес для понимания взаимосвязи между гетеротрофной фиксацией и дыханием, поэтому мы провели дополнительные исследования с целью определить факторы, вызывающие усиление гетеротрофной фиксации предшествующим анаэробнозом.

Предстояло сделать выбор между двумя возможными объяснениями «эффекта Михайловой». Либо анаэробноз обеспечивает накопление 3-углеродных акцепторов, либо индуцирует синтез или увеличивает активность ФЭП-карбоксилаз.

Методика. Для опытов использовали верхушечные доли средних ярусов листьев картофеля сорта Лорх. Срезанные листья помещали в герметизированные камеры, через которые проходил ток воздуха, многократно промытого в пирогаллоловых поглотителях O_2 . Остаточная концентрация кислорода в камерах около 1,5%.

Через контрольные камеры пропускали обычный воздух, промытый от CO_2 в щелочных поглотителях. Концентрацию углекислоты поддерживали на уровне приблизительно около 0,1% в конт-

рольных и бескислородных камерах, используя для этого баллонную углекислоту.

Спустя 1—2 часа листья извлекали из камер и переносили в ассимиляционные камеры с обычным воздухом, в которых определяли гетеротрофную фиксацию CO_2 в темноте. Для этого в камеры вводили C^{14}O_2 с удельной активностью около 150 милликюри/л CO_2 и создавали концентрацию, близкую к естественной, не выше 0,05 %.

После 20-минутной экспозиции листья фиксировали кипящим этанолом. Для радиометрии и радиохимического анализа использовали сухие порошки листьев.

Адекватные образцы листьев, извлеченных из камер, использовали для определения активности ФЭП-карбоксилазы. ФЭП-карбоксилазу определяли по следующей методике. Высечки из листьев общей площадью 25 cm^2 растирали на холоду в 2,5 мл 1/15 М фосфатного буфера с добавкой 10 мкмоль восстановленного глутатиона. Гомогенат отжимали через ткань и центрифугировали при 20 000 g. Надосадочную жидкость использовали как препарат для определения активности ФЭП-карбоксилазы.

Реакционная смесь общим объемом 3,5 мл содержала 2,5 мл ферментного экстракта (что соответствует 2,5 мг белка), 10 мкмоль восстановленного глутатиона, фосфатный буфер pH 7,4, а также НАД- H_2 —0,5 мкмоль, ФЭП—3,6 мкмоль, $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$ с удельной активностью 100 милликюри/л CO_2 —30 мкмоль. Реакцию вели при t 38° и в течение 30 мин. отбирали серию проб. Пробы по 0,3 мл фиксировали равным объемом слабого раствора HCl. Контрольные определения проводили на экстракте без добавки ФЭП и НАД- H_2 . Кроме того, были поставлены определения с введением в реакционную смесь НАД- H_2 или глутатиона. Таким путем сравнивали два способа стабилизации щавелевоуксусной кислоты: за счет эндогенной малатдегидрогеназы или глутамат-аминотрансферазы.

Результаты исследований. В первой серии опытов был проведен эффект, описанный Михайловой. Оказалось, что исключение кислорода в предшествующий период действительно значительно усиливает последующую гетеротрофную фиксацию.

В нескольких опытах, где листья экспонировали 1—2 час. в камерах с 21% и 1,5% O_2 , последующая гетеротрофная фиксация имела скорости соответственно 13—30 и 55—72 мкмоль CO_2 /g сухих листьев за час. Таким образом, анаэробиз в 2,5—4 раза усиливал последующую гетеротрофную фиксацию.

При радиохимическом анализе листьев выяснили, что анаэробиз в 6 раз усилил образование малата и не оказал влияния на образование щавелевоуксусной кислоты и аспартата (см. таблицу).

Отношение малат/аспартат составляет 0,63 после выдерживания листьев в аэробной среде и 5,4 в анаэробной. Такое смещение в соотношении 4-углеродных кислот, синтезируемых при гетеро-

трофной фиксации, отмечала и Михайлова (1968). Оно может быть объяснено снижением скорости окисления НАД-Н₂ при анаэробнозе, когда создаются благоприятные условия восстановления щавелевоуксусной кислоты до малата.

Таблица

Распределение С¹⁴ в продуктах гетеротрофной фиксации после предшествующего анаэробноза в темноте

Перед опытом	Аспаргат		Малат		Отношение малата к аспаргату
	тыс. имп.	%	тыс. имп.	%	
	1000 мг сухого веса		1000 мг сухого веса		
+O ₂ +CO ₂	2080	47,7	1300	30,0	0,63
-O ₂ +CO ₂	1660	13,0	8960	70,0	5,40

При изучении ФЭП-карбоксилазной активности сначала были определены скорости фиксации С¹⁴О₂ при добавлении различных кофакторов в реакцию смесь. Данные такого опыта (рис. 1) показали, что экстракт из листьев без добавки ФЭП и восстановителя фиксирует С¹⁴О₂ со скоростью 11 *мкмоль* на г сухих листьев за час. Следовательно уже в нативном экстракте содержится не только карбоксилаза, но и ее субстрат. Добавка ФЭП увеличивает скорость фиксации углекислоты почти в 2 раза (21 *мкмоль* СО₂ на г сухих листьев за час). Наибольшая скорость фиксации СО₂ обнаружена при совместном введении ФЭП и НАД-Н₂ (24 *мкмоль* СО₂ на г сухих листьев за час).

Введение в реакцию смесь восстановителей без ФЭП не изменило существенно скорости карбоксилирования. Поэтому определение ФЭП-карбоксилазы у опытных и контрольных вариантов производили с введением ФЭП и НАД-Н₂ в реакцию смесь.

Сравнение активности ФЭП-карбоксилазы у листьев, предварительно выдержанных в аэробной и анаэробной среде (рис. 2), показало более высокую активность фермента в листьях, находившихся в аэробных условиях. Следовательно, увеличение скорости гетеротрофной фиксации после предшествующего анаэробноза нельзя объяснить увеличением активности ФЭП-карбоксилазы. 1—2-часовой анаэробноз вызывает даже заметное понижение ФЭП-карбоксилазной активности листьев.

Из этих фактов следует, что усиление гетеротрофной фиксации предшествующим анаэробнозом нужно связывать не с изменением активности фермента или его количества, а с субстратными особенностями карбоксилирования в сравниваемых листьях.

Можно предположить, например, что в условиях анаэробноза, когда ограничена активность цикла Кребса, но продолжает функционировать гликолиз, могут накапливаться продукты гликоли-

за — пируват или фосфоэнолпируват. В этих условиях при выключении терминального акцептора (O_2) задерживается также окисление НАД- H_2 и может повышаться отношение НАД- H_2 /НАД. Поступление CO_2 в клетку в этой ситуации обеспечивает утилиза-

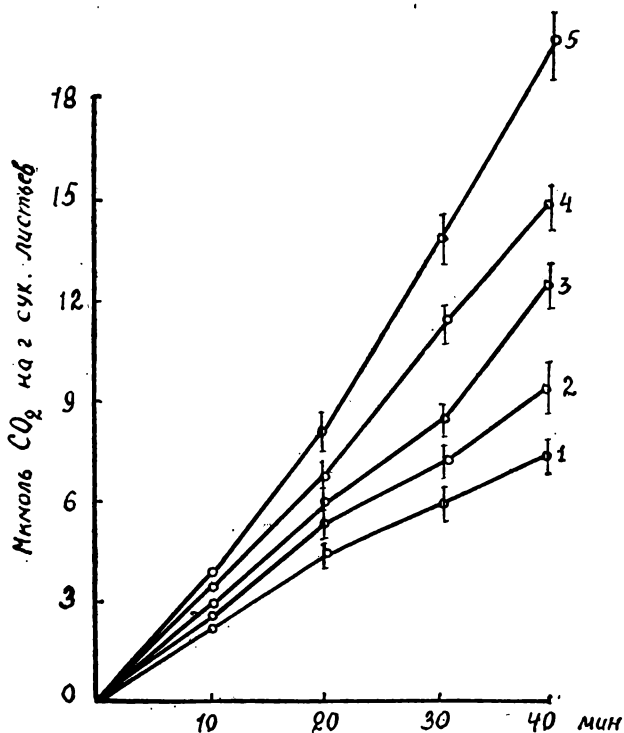


Рис. 1. Влияние состава реакционной среды на активность ФЭП-карбоксилазы из листьев картофеля.

1 — без добавки ФЭП и восстановителей; 2 — добавка только НАД- H_2 ; 3 — добавка глутамат и ФЭП; 4 — добавка ФЭП; 5 — добавка ФЭП+НАД=H2.

цию ФЭП и окисление НАД- H_2 , осуществляемое ФЭП-карбоксилазой и малат-дегидрогеназой.

Таким образом, CO_2 выступает как окислитель по отношению к НАД- H_2 . Такое положение сохраняется некоторое время после перенесения контрольных и опытных листьев в аэробную среду.

Подтверждением этого предположения мог бы быть следующий факт. Экстракты из листьев, предварительно выдержанных в аэробной и анаэробной среде, должны существенно отличаться по фиксации $C^{14}O_2$, если в смесь не добавлены ФЭП и НАД- H_2 , а добавка субстрата и восстановителя должна усилить общую скорость фиксации и сократить разницу между вариантами.

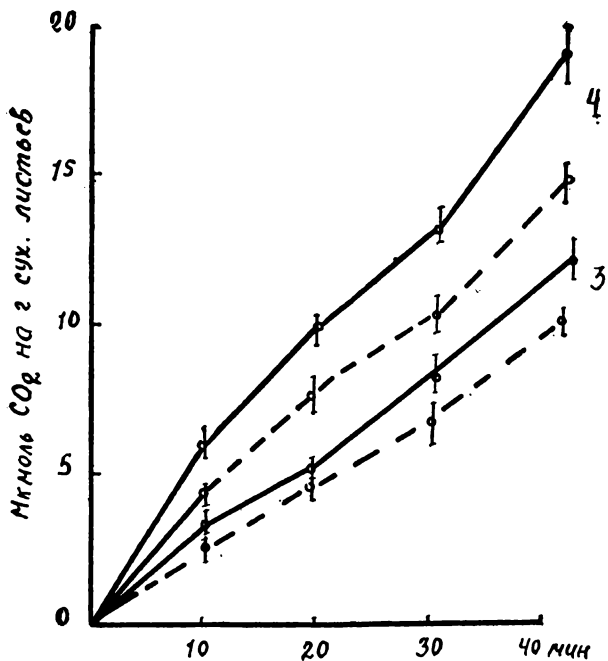
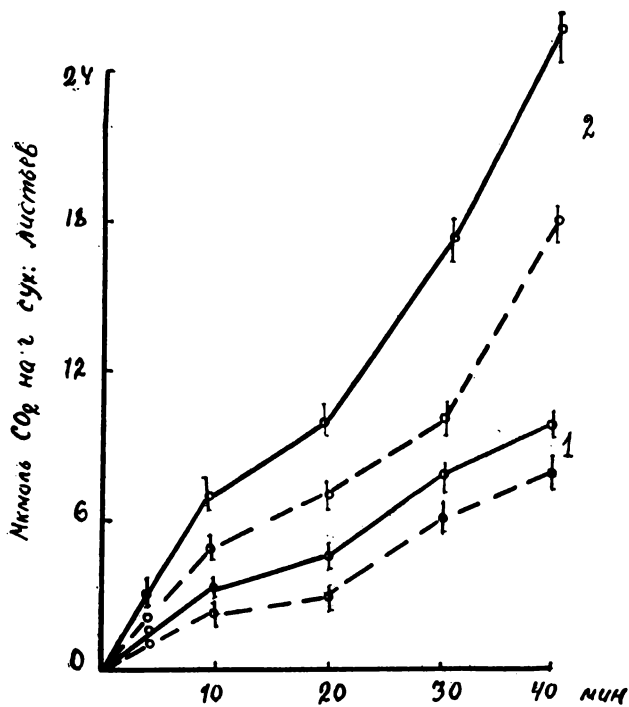


Рис. 2. Влияние предшествующего анаэробноза на активность ФЭП-карбоксилазы из листьев картофеля.

— — перед опытом 20% O_2 , — — — перед опытом 1,5% O_2 . 1 — без добавки ФЭП и восстановителей; 2 — добавка только $\text{НАД}=\text{H}_2$; 3 — добавка ФЭП и $\text{НАД}=\text{H}_2$; 4 — добавка только ФЭП.

Действительно, такое явление было получено при работе с листьями бобов. Из рис. 3 следует, что фиксация CO_2 при введении в реакцию смесь ФЭП и НАД- H_2 происходит почти одинаково у листьев обоих вариантов. Если субстрат и кофактор карбоксилирования не вводили в реакцию смесь, то скорость

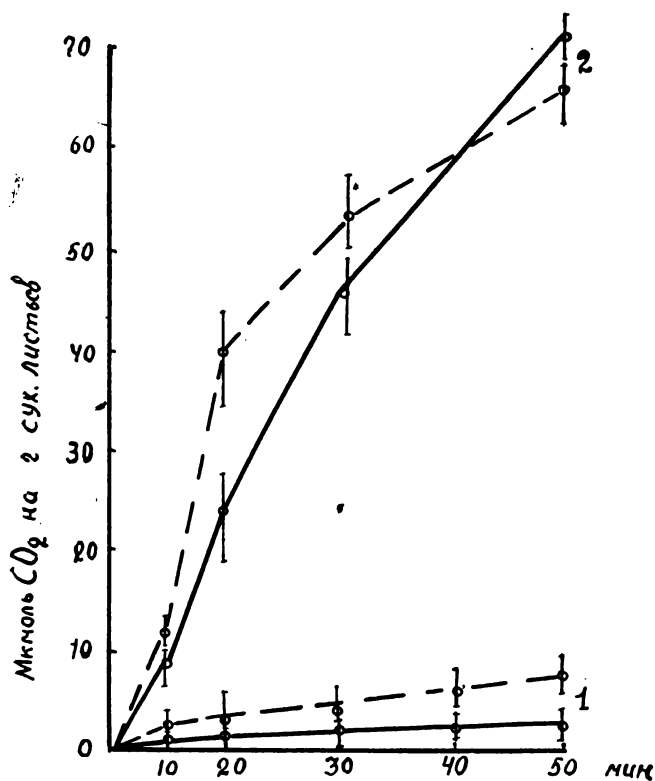


Рис. 3. Влияние предшествующего анаэробноза на активность ФЭП-карбоксилазы из листьев бобов. — перед опытом 20% O_2 ; - - - перед опытом 1,5% O_2 . 1 — без добавки ФЭП и восстановителей; 2 — добавка ФЭП и НАД- H_2 .

фиксации CO_2 больше в экстрактах, полученных из листьев, выдержанных в анаэробных условиях.

На основании этого можно заключить, что эффект усиления гетеротрофной фиксации CO_2 после выдерживания листьев в бескислородной среде объясняется накоплением в тканях ФЭП и НАД- H_2 при подавлении аэробного дыхания. Это заключение нуждается в дополнительном подтверждении, которое может быть получено прямым определением содержания ФЭП и НАД- H_2 при анаэробнозе.

Так как концентрация O_2 в камерах (1,5%) значительно выше критической концентрации, полностью отключающей цикл Кребса, то необходимо иметь в виду, что описанные здесь факты получены при частичном ограничении аэробного дыхания.

Выводы. 1. 1—2-часовое экспонирование листьев картофеля и бобов на свету или в темноте в атмосфере с нормальной (21%) и низкой (1,5%) концентрациями O_2 вызывает усиление гетеротрофной фиксации CO_2 (в кислородной атмосфере) в 2,5—4 раза. Этот эффект достигается многократным усилением синтеза яблочной кислоты.

2. Предшествующий анаэробизму не увеличивает, а иногда снижает активность ФЭП-карбоксилазы. Экстракты из листьев бобов существенно отличаются по скорости фиксации $C^{14}O_2$ на эндогенном акцепторе, а после добавки в среду ФЭП и НАД- H_2 эти различия исчезают.

3. Эффект усиления гетеротрофной фиксации предшествующим анаэробизмом объясняется не изменением активности ФЭП-карбоксилазы, а изменением содержания субстрата (ФЭП) и восстановителя (НАД- H_2) при частичном ограничении аэробного дыхания.

ЛИТЕРАТУРА

Михайлова Т. Л., 1968. О влиянии анаэробизма на последующую гетеротрофную фиксацию листьями углекислого газа. — «Научн. докл. высш. школы. Биол. науки», № 6, 79—82.

Мокроносков А. Т., Михайлова Т. Л., 1962. Темновая фиксация CO_2 листьями картофеля. — «ДАН», 147, № 3, 1226—1229.

Мокроносков А. Т., Пономарева Р. П., Логвина М. Г., 1963. Метаболизация и передвижение продуктов темновой фиксации CO_2 у картофеля. — «Физиол. растений», 10, № 5, 525—534.

Kluge M., Kriebitzsch A., Willert D. J. V., 1974. Dark fixation of CO_2 in crassulacean acid metabolism: are two carboxylation steps involved? — "L. Pflanzenphysiol.", 72, N 5, 460—465.

Saltman P., Kunitake J. M., Spolter A., 1957. The dark fixation of CO_2 by succulent leaves: metabolic changes subsequent to initial fixation — "Plant Physiol.", 32, N 3, 197—200.