

П. А. КОЛЕСНИКОВ

ОБ УЧАСТИИ ГЛИОКСИЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В АССИМИЛЯЦИИ НИТРАТНОГО АЗОТА ЗЕЛЕНЫМИ ЛИСТЬЯМИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 II 1950)

До настоящего времени не имеется единого мнения о месте и химизме ассимиляции нитратного азота зелеными растениями. Некоторые исследователи утверждают, что нитраты ассимилируются только в зеленых листьях и на свету, другие считают, что это имеет место в любом органе растения и не зависит от света. В настоящем сообщении приводятся некоторые данные об ассимиляции нитратов зелеными листьями. Объектами исследования служили ячмень и кок-сагыз. Нитраты определялись по методу Риема (1), нитриты и гидроксилламин — по методу Блема (2), оксимы — по методу Эндерса (3) (этот метод хотя и не является достаточно точным, позволяет с достоверностью обнаруживать оксимы). Глиоксилевая кислота и аллантоин определялись по методу Фостера и Эстера (4). Определения производились путем растирания ткани с водой 1 : 10 и осаждением $\frac{1}{10}$ объемом 1 М ацетатным буфером рН 4,4. Опыты по обмену веществ в суспензии хлоропластов и хлорофильных гранул проводились в приборе Варбурга. Суспензия хлоропластов и хлорофильных гранул получалась, как описано раньше (5). В каждый сосудик Варбурга бралось по 4 мл суспензии и общий объем доводился до 5 мл растворами испытуемых веществ.

В согласии с литературными данными установлено, что в листьях ячменя, в зависимости от содержания нитратов в почве, на которой выращивался ячмень, могут накапливаться различные количества нитратного азота. В листьях ячменя, выращенного на богатой нитратами почве, было найдено до 0,5% нитратов на сырой вес. Такие же явления наблюдались и у кок-сагыза. Ниже приводятся типичные данные по количеству нитратов в кок-сагызе, взятом для анализа из различных мест, в разное время лета 1949 г.

Листья кок-сагыза по типу отличаются от листьев ячменя. Как видно из табл. 1, нитраты в них концентрируются, главным образом, в центральной жилке. Их меньше в листовых пластинках и очень мало в корнях.

Обнаружено, что листья обладают сильной восстановительной способностью по отношению к нитратам. Ранее мною было показано, что в суспензии хлоропластов и хлорофильных гранул из листьев ячменя в темноте накапливаются перекисные соединения в больших количествах (5). Перекисные соединения определялись по выделению иода из иодистого калия в кислой среде. Оказалось, что эти вещества, разлагающие иодистый калий, являются нитритами. Количество нитритов увеличивается, если к суспензии прибавить нитраты в количестве, не превышающем 0,1 М. При более высоких концентрациях нитратов количество

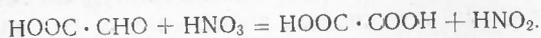
Распределение нитратного азота в кок-сагызе
(в γ на 1 г сырой массы)

	Опытное поле в Михнево	Опытн. поле Ин-та генетики	Выращенные в оранжерее	
			опыт № 1	опыт № 2
Листовые пластинки	1060	1020	97	оч. мало
Главные жилки	1661	1964	1205	261
Черешки	1172	855	1324	208
Корень — у шейки	92	101	оч. мало	оч. мало
Корень — середина	126	оч. мало	" "	" "
Корень — нижняя часть	125	" "	" "	" "

нитритов, наоборот, уменьшается, а при концентрации нитратов 0,5 М нитриты не образуются.

Образование нитритов связано с хлоропластами и хлорофильными гранулами. Если зеленую суспензию профильтровать через плотный фильтр (на стеклянный фильтр помещается слой волокнистого асбеста, затем слой мяги из фильтровальной бумаги) с отсасыванием, то твердые зеленые частички остаются на фильтре и получается бесцветный, слабо мутноватый раствор. Нитриты образуются только на смоченном зеленом осадке и вовсе не образуются в растворе. Нитриты образуются только в аэробных условиях. Известно, что в зеленых клетках нитраты восстанавливаются в нитриты ферментативно с участием альдегидов. Поэтому можно было ожидать, что в аэробных условиях в суспензии образуются альдегиды, которые и участвуют в восстановлении нитратов.

Ранее ⁽³⁾ мною было показано, что в исследуемой мною суспензии содержится фермент, окисляющий гликолевую кислоту в глиоксилевую. Кроме того, было показано, что глиоксилевая кислота, особенно на свету, образуется в суспензии из каких-то других веществ, неидентичных гликолевой кислоте. Оказалось, что такими веществами являются продукты распада пуриновых оснований. Методом Фостера с сотрудниками ⁽⁴⁾ установлено, что в суспензии содержится аллантиин. Метод основан на определении количества глиоксилевой кислоты, образуемой при щелочном гидролизе аллантиина. Кроме того, в суспензии содержатся вещества, которые распадаются с образованием глиоксилевой кислоты при кипячении суспензии в нейтральной или слабо кислой среде. Такими свойствами обладают аллантииновая и уруксановая кислоты. Накопление глиоксилевой кислоты в суспензии при освещении сопровождается уменьшением количества этих менее стабильных веществ. Таким образом, в суспензии хлоропластов и хлорофильных гранул в аэробных условиях из различных веществ образуется альдегидокислота — глиоксилевая кислота. Обнаружено, что на свету и в темноте, но в присутствии гликолевой кислоты, т. е. в условиях, когда образуется глиоксилевая кислота, количество нитратов в суспензии снижается. Это говорило о возможности восстановления нитратов в нитриты с участием глиоксилевой кислоты:



Но в этих условиях нитриты или не были обнаружены совсем, или обнаружены в очень малых количествах. Оказалось, что нитриты, с участием глиоксилевой кислоты, превращаются дальше. Так например, из добавленных на сосудик 34,5 γ N-нитритов на свету через 3 часа

осталось 28 γ, а в темноте это количество не изменилось. Однако нитриты исчезают и в темноте, но при наличии источника глиоксильевой кислоты — гликолевой кислоты. Так например, из добавленных на судик 345 γ или 34,5 γ N-нитритов за 60 мин., соответственно, осталось 240 и 15 γ. Эти факты объясняют отсутствие нитритов в опытах с нитратами. Образовавшиеся нитриты из нитратов по мере образования превращаются дальше, поэтому они и не могли быть обнаружены. Частично нитриты превращаются в гидроксилламин (см. табл. 2).

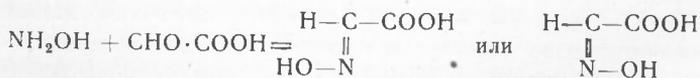
Таблица 2

Восстановление нитратов в гидроксилламин
(взято 7,7 γ N—NO₂, продолжительность 60 мин.)

Условия опыта	Найдено после инкубации γ N на судик		
	NO ₂	NH ₂ OH	неизв. соединения
Гликолевая кислота + + NaNO ₂	6,2	0,72	0,70
То же + аскорбиновая кислота	3,19	3,0	0,51
Гликолевая кислота . .	0	0	0
NaNO ₂	7,6	0	0

По данным Лемуаня (6), нитриты хорошо восстанавливаются в гидроксилламин аскорбиновой кислотой в чистых растворах. Эта реакция легко воспроизводима. Из табл. 2 видно, что аскорбиновая кислота хорошо восстанавливает нитриты в гидроксилламин и в суспензии. Можно бы думать, что восстановление нитритов в гидроксилламин в присутствии гликолевой кислоты вызвано аскорбиновой кислотой, которая могла находиться в суспензии. Однако в пробе с нитритами, но без гликолевой кислоты восстановление нитритов не наблюдалось. Следовательно, это восстановление обусловлено наличием гликолевой кислоты. О необходимости наличия альдегидов для восстановления нитритов было показано для других растений Д. Михлиным (7).

В свою очередь гидроксилламин также не накапливается в суспензии, а претерпевает дальнейшие превращения. Ранее мною было показано (5), что если к зеленой суспензии прибавить гидроксилламин, то на свету глиоксильевая кислота не накапливается, а в темноте при наличии гликолевой кислоты накапливается в меньших количествах, а внесенная извне глиоксильевая кислота быстрее претерпевает превращения. Известно, что глиоксильевая кислота, особенно свежеприготовленная, образует с гидроксилламином оксим — оксимидоуксусную кислоту:



Этот оксим, как и гидроксамовые кислоты, дает с хлорным железом красное окрашивание. Оказалось, что прибавленный к суспензии гидроксилламин в тех условиях, в которых образуется глиоксильевая кислота, так же как и последняя, претерпевает превращения. Обнаружено, что гидроксилламин в этих условиях частично превращается в нитриты, в оксимы и неизвестные азотистые соединения. Так например, на свету из внесенных 21,4 γ N—NH₂OH за 2 часа превратилось 18,85 γ, а в темноте 8,9 γ. Из 37,1 γ, соответственно, 32,9 и 17,8 γ и т. п. Эти превращения в темноте в присутствии гликолевой кислоты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Образование оксимов из гидроксиламина и
глиоксильевой кислоты
(продолжительность 90 минут, в γ на сосудик)

	Опыт № 1	Опыт № 2
Внесено N — NH ₂ OH	23,9	46,2
Осталось N — NH ₂ OH	2,54	0,11
Обнаружено в форме NO ₂	0,21	2,13
" оксимов	8,84	7,66
" неизвестных соедине- ний	12,31	36,3
Обнаружено N — NH ₂ OH в пробе без гликолевой кислоты	—	46,8

Среди неизвестных азотистых соединений может быть и аллантион, который, как известно, может синтезироваться из продуктов его распада — глиоксильевой кислоты и мочевины.

Суммируя все приведенные факты, мы видим, что нитраты поступают в листья. В листьях содержатся вещества, являющиеся источниками глиоксильевой кислоты. Нитраты с участием глиоксильевой кислоты восстанавливаются в нитриты и гидроксиламин. Глиоксильевая кислота с гидроксиламином образует оксимы и другие, еще неизвестные азотистые соединения. Эти данные позволяют считать, что листья являются главным местом ассимиляции нитратов растениями и что в ассимиляции участвует глиоксильевая кислота.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
10 I 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. К. Гедройц, Химический анализ почв, 1932, стр. 427. ² J. Blöm, Ber., 25, 713 (1892). ³ G. Enders, Lieb. Ann., 518, 109 (1925). ⁴ P. Foster and M. Esteres, Journ. biol. Chem., 155, 161 (1944). ⁵ П. Колесников, ДАН, 60, № 7 (1948); Биохимия, 14, в. 2, 124 (1949). ⁶ M. Lemoigne, P. Monguilon et R. Desvaux, Bull. Soc. chim. biol., 18, 868 (1936). ⁷ Д. Михлин, ДАН, 20, № 2—3 (1938).