

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

И. И. ГУНАР и Е. Е. КРАСТИНА

УГОЛЬНАЯ АНГИДРАЗА В РАСТЕНИЯХ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 25 XII 1951)

Как в растительном, так и в животном организмах большое физиологическое значение имеет обратимая реакция гидратации и дегидратации угольной кислоты. Это, в первую очередь, выделение  $\text{CO}_2$  при дыхании, а также, возможно, поглощение растением  $\text{CO}_2$  на свету и в темноте. Однако некатализируемая реакция  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  протекает очень медленно, а именно: при одинаковых условиях в 300 раз медленнее, чем фактическое освобождение  $\text{CO}_2$  из крови, и в 2000 раз медленнее, чем поглощение  $\text{CO}_2$  растением при фотосинтезе <sup>(10)</sup>. Катализатором этой реакции в живом организме является фермент — угольная ангидраза. У позвоночных животных главным носителем угольной ангидразы являются эритроциты крови; у беспозвоночных животных угольная ангидраза — тканевой фермент <sup>(4, 6, 10)</sup>.

Растительная угольная ангидраза обнаружена в листьях многих высших растений, причем как в хлоропластах, так и в других частях клетки <sup>(8, 9, 11)</sup>. В литературе имеются указания об отсутствии угольной ангидразы в корнях растений, а также в листьях картофеля, сахарной свеклы и салата <sup>(8)</sup>. В одноклеточных зеленых растениях (хлорелле и сценедесмусе) не удалось обнаружить этого фермента <sup>(11)</sup>.

Растительная угольная ангидраза — цинксодержащий фермент. Активность ее подавляется слабыми растворами (0,01—0,001 M)  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{J}_2$  <sup>(9)</sup>. В отличие от животной угольной ангидразы растительный фермент сильнее снижает свою активность под влиянием специфических инактиваторов сульфгидрильных групп (—SH) — *n*-хлормеркурбензола и иодбензола — и слабее подавляется цианидами, азидами и специфическим инактиватором животной угольной ангидразы — сульфаниламидом; тиоцианаты инактивируют оба фермента приблизительно в равной мере <sup>(8)</sup>.

Растительная угольная ангидраза разрушается при температуре 70° в течение 30—60 мин. и при 80° в течение 5 мин. <sup>(9)</sup>. Водные экстракты из листьев растений довольно быстро теряют ангидразную активность, тогда как цистеиновые обладают сравнительной устойчивостью <sup>(8)</sup>.

Остается почти совсем еще невыясненной роль угольной ангидразы в жизни растений. Имеются лишь косвенные доказательства о значении этого фермента для фотосинтеза и дыхания растений. Д. М. Михлин и З. С. Бронувицкая <sup>(7)</sup> определяли фотосинтез и дыхание хлореллы при добавлении к ее суспензии некоторого количества очищенного препарата животной угольной ангидразы. При этом они установили, что при pH 8 (благоприятном для катализа ферментом гидратации  $\text{CO}_2$ ) прибавление фермента ускоряет фотосинтез в значительно большей степени, чем дыхание; но в слабо кислой среде (pH 6,1), благоприятной для ускорения

реакции дегидратации  $H_2CO_3$ , прибавление фермента несколько ослабляет фотосинтез.

Исследованиями Е. А. Бойченко (1) было установлено, что образование в хлоропластах продуктов восстановления  $CO_2$  связано с наличием комплекса, содержащего железо, медь и цинк. Можно предположить, что присутствие этих металлов в комплексе обуславливается наличием в нем металлсодержащих ферментов, в том числе и цинксодержащей угольной ангидразы.

В настоящей работе сообщаются результаты некоторых исследований по угольной ангидразе, проводимых нами с целью выяснения внутренних и внешних причин изменения активности растительного фермента. Растения выращивались в песчаных культурах на питательной смеси Кнопа или (в случае использования проростков) проращивались на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой. Активность угольной ангидразы определялась в водной вытяжке из растений колориметрическим методом Бринкмана — Крепса (5), основанном на определении скорости гидратации  $CO_2$ .

Во всех испытанных нами объектах (листьях овса, пшеницы, пырея ползучего, горчицы, корнях кукурузы и гороха) была обнаружена ангидразная активность. Величина этой активности, выражаемая отношением  $(R-R_0)/R_0$  (где  $R$  — скорость реакции без фермента и  $R_0$  — скорость реакции в присутствии фермента), не является постоянной для одного и того же растения, а резко колеблется в зависимости от физиологического возраста листа, условий выращивания растений и т. д. В большинстве случаев активность угольной ангидразы увеличивается от нижних ярусов листьев к верхним, т. е. чем моложе лист, тем выше в нем активность фермента. Кроме того, условия выращивания растений, влияющие на скорость развития и старения растения (например температура), также сказываются на активности этого фермента. В табл. 1 приводятся данные, полученные нами в опытах с яровой пшеницей Лютесценс 062 и озимой пшеницей Украинкой, выращиваемых при разных температурах в стадию яровизации.

Таблица 1

Дата опыта	Т-ра в °		Активность угольной ангидразы в листьях (считая снизу)		
	день	ночь	первом	втором	третьем

Лютесценс 062

31 III	18	15	0,66	0,92	
	23	15	0,17	0,96	
2 IV	18	15	7,00	—	
	23	15	2,53	—	
7 IV	18	15	1,00	1,66	1,86
9 IV	18	15	0,48	0,40	

Украинка

29 III	0—2	0—2	0,25	2,00	
	15	12	0,88	1,50	
3 IV	0—2	0—2	3,00	6,70	2,23
	15	12	1,74	1,78	
10 IV	0—2	0—2	1,61	2,75	0,67
	15	12	0,77	0,71	

По мере развития растения изменяется и степень влияния на активность угольной ангидразы различных химических веществ (ингибиторов). Можно привести следующий опыт. Овес Московский А-315 в разные фазы развития опрыскивался 0,02% водным раствором изопропилфенилкарбамата (ИФК), который тормозит процессы фотосинтеза и дыхания злаков и является селективным гербицидом против сорняков-злаков (2, 3). Через сутки после опрыскивания овса в его листьях определялась активность угольной ангидразы. Полученные результаты показывают (см. табл. 2), что инактивация фермента тем сильнее, чем моложе опытные растения.

Таблица 2

Календарный возраст овса в днях	Фаза развития	Активность угольной ангидразы		Инактивация фермента в %
		в контроле	в опрыснутом овсе	
9	2 листа . . . . .	0,85	0,00	100
12	3 " . . . . .	1,42	0,25	82,4
15	3 " . . . . .	1,76	0,59	66,5
29	Выход в трубку . . . . .	1,94	2,20	0

Снижение активности фермента после опрыскивания овса карбаматом бывает наибольшим в первые сутки, в дальнейшем же активность угольной ангидразы постепенно восстанавливается (см. табл. 3). Степень инактивации фермента зависит также от дозы ИФК, увеличиваясь по мере роста последней (см. рис. 1).

Кроме карбаматов, можно отметить еще несколько веществ из группы азотсодержащих органических соединений, которые в той или иной мере инактивируют угольную ангидразу злаков. Это хлорацетанилид,  $\alpha$ -нафтилтиомочевина, тиомочевина и мочевины.

Нами была обнаружена угольная ангидраза и в корнях растений (проростки кукурузы Стерлинг и гороха Капитал), причем по своему отношению к ингибиторам она не отличалась от ангидразы листьев. Ингибиторы вводились в корни проростков методом вакуум-инfiltrации. Данные одного из опытов приводятся в табл. 4.

При сравнении угольной ангидразы растений разных систематических групп нами было обнаружено, что фермент двудольных растений не инактивируется карбаматами, причем это верно как для ангидразы листьев, так и для ангидразы корней (см. табл. 5). Этот факт становится еще более интересным, если учесть избирательность гербицидного действия карбаматов: они резко нарушают рост и развитие злаков и почти не влияют на двудольные растения.

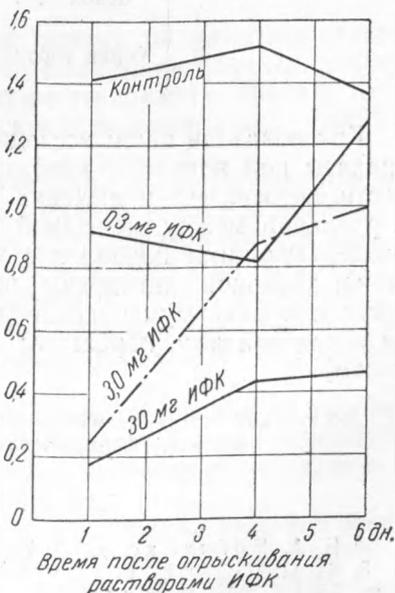


Рис. 1. Активность угольной ангидразы

Таблица 3

№ опыта	Фаза развития овса в момент опрыскивания	Срок определения после опрыскивания в днях	Активность угольной ангидразы в овсе	
			в контроле	опрысканном ИФК (3 мг на сосуд)
1	2 листа	1	0,85	0,00
		3	0,77	0,09
		6	0,80	0,40
2	3 "	9	0,91	0,31
		1	1,42	0,25
		4	1,53	0,88
		6	1,37	1,00

Таблица 4

Схема инфильтрации	Активность угольной ангидразы в корнях проростков кукурузы
Вода дистиллированная . . . . .	2,45
0,02% ИФК . . . . .	1,50
0,20% ИФК . . . . .	1,25
0,02% хлорацетанилид . . . . .	1,24
0,20% мочевины . . . . .	1,11
0,20% тиомочевина . . . . .	0,66

Таблица 5

№ опыта	Растительный объект	Срок определения после введения ИФК	Активность угольной ангидразы	
			контроль	0,02% ИФК
1	Листья горчицы сизой . . . . .	1 сутки	0,99	0,98
		2 "	1,62	1,50
2	Листья горчицы белой . . . . .	1 "	2,57	2,27
		2 "	1,56	1,51
3	Корни гороха . . . . .	30 мин.	1,17	1,10

Как показали наши исследования, снижение активности угольной ангидразы под влиянием карбаматов сопровождается падением интенсивности фотосинтеза и дыхания злаков. Однако не наблюдается прямой корреляции между величиной инактивации фермента и величинами, характеризующими подавление этих физиологических процессов. Инактивация угольной ангидразы прямо пропорциональна дозе карбамата, тогда как максимум подавления фотосинтеза и дыхания злаков относится к средней дозе карбамата (3,0 мг на сосуд ИФК в наших опытах с овсом).

Московская сельскохозяйственная академия  
им. К. А. Тимирязева

Поступило  
25 XII 1951

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Е. А. Бойченко, ДАН, 70, № 6 (1950). <sup>2</sup> И. И. Гунар, Докл. ТСХА, в. 5, 84 (1947). <sup>3</sup> Е. Е. Крастиня, Диссертация, С.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, 1951. <sup>4</sup> Е. М. Крепс, Усп. совр. биол., 17, № 2 (1944). <sup>5</sup> Е. М. Крепс и Е. Ю. Ченыкаева, Военно-мед. сборн., 1, 14 (1944). <sup>6</sup> Е. М. Крепс, Тр. Физиол. ин-та им. И. П. Павлова, № 1 (1945). <sup>7</sup> Д. М. Михлин и З. С. Броновицкая, Биохимия, 10, в. 4 (1945). <sup>8</sup> J. R. G. Bradfield, Nature, 159, 467 (1947). <sup>9</sup> R. Day and J. Franklin, Science, 104, 363 (1946). <sup>10</sup> H. van Goog, Enzymologia, 13, 73 (1948). <sup>11</sup> A. C. Neish, Biochem. Journ., 33, 300 (1939).