

Б. А. РУБИН и Н. В. ОБРУЧЕВА

ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ

(Представлено академиком В. Н. Шапошниковым 16 I 1954)

Зольное и азотное питание высших растений, как показал В. Р. Вильямс (1), осуществляется в природе в результате их симбиоза с микроорганизмами и грибами почвы. Одним из примеров такого тесного сожительства организмов, далеко отстоящих друг от друга в эволюционном ряду, может служить микориза — симбиоз корней растений с мицелием грибов, свойственный большинству наших древесных и кустарниковых растений. Физиологическая сущность этого явления может быть раскрыта только путем последовательного изучения физиологии самого гриба-микоризообразователя, корневой системы высшего растения и изменений, наступающих при взаимодействии обоих организмов. Начатая нами работа имела целью изучение некоторых сторон физиологии микоризных грибов.

Одной из наиболее характерных особенностей грибов-микоризообразователей является их способность использовать в качестве источника питания определенные формы углеводов. Следует считать установленным, что мицелий микоризных грибов хорошо растет только на средах, содержащих в качестве источника углерода глюкозу; почти не используются им ди- и трисахариды, крахмал, инулин, клетчатка, глюкозиды, органические кислоты и шестиатомные спирты (2, 4-7). Поскольку имеющиеся в почве количества глюкозы недостаточны для развития мицелия микоризных грибов (5), потребности свои в углеводах они удовлетворяют за счет глюкозы, получаемой из корней высших растений (8). Кроме того, грибы-микоризообразователи используют, очевидно, глюкозу, образующуюся в почве в результате гидролитической деятельности других представителей почвенной микрофлоры.

Для микоризных грибов характерна слабая активность протеолитических ферментов; наилучшими источниками азота для них являются аммонийные соли неорганических кислот и мочевины (4).

Почти совершенно неизученной остается до настоящего времени окислительная система грибов-микоризообразователей. В литературе встречаются указания на то, что для развития мицелия необходим кислород (9). У некоторых видов грибов при помощи качественных реакций обнаружены ферменты, окисляющие фенолы (6, 10). Лишь в одной из работ приводятся данные по активности полифенолоксидазы и тирозиназы в мицелии и плодовых телах микоризных грибов *Lactarius deliciosus* и *Boletus rufus*.

Все изложенное показывает, что систематическое изучение физиологических особенностей микоризных грибов по существу еще не начиналось. Между тем познание природы взаимодействия между грибами-микоризообразователями и их хозяевами невозможно без детальной характеристики физиологических свойств каждого из компонентов этого комплекса. Первым этапом начатой нами работы явилось изучение гидролитических и окислительных ферментов плодовых тел и мицелия трех видов микориз-

ного гриба *Boletus: B. luteus* Fr.—масленок поздний, *B. edulis* Fr.—белый гриб и *B. subtomentosus* Fr.—моховик зеленый

Необходимый для исследования мицелий грибов мы получали от Я. П. Худякова и Ю. М. Возняковской (Московское отделение Института сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ). Мицелий выращивался при комнатной температуре в погруженной культуре при рН 5,5 в течение 20—25 дней. Питательной средой служил картофельный (для белого гриба) или капустный (для масленка) отвар, в который добавлялись глюкоза и автолизат дрожжей. Перед проведением опытов культуральную жидкость стерильно отделяли при помощи сифона; взвесь мицелия стерильно разливали и хранили до исследования при температуре 3—5°. Определение активности гидролаз в культуральной жидкости проводилось в тот же день. Перед самым проведением анализов мицелий отфильтровывался и слегка подсушивался между листами фильтровальной бумаги. Для определения ферментов в ткани плодового тела отбирали среднюю пробу из ножек и шляпок 5—6 грибов, предварительно очищенных от кожицы и гимениального слоя. Одновременно с взятием навески для исследования ферментативной активности бралась проба на определение влажности материала.

Измерения интенсивности дыхания мицелия и плодовых тел производились манометрически в аппарате Варбурга при 25°. В опытах с плодовыми телами использовалась растертая ткань; наблюдения над мицелием проводились со взвесью последнего в фосфатно-цитратном буфере при рН 6,0. Активность аскорбиноксидазы и полифенолоксидазы определялась по поглощению кислорода в аппарате Варбурга после добавления соответствующих субстратов окисления: аскорбиновой кислоты (конечная концентрация 0,01 M) и пирогаллола, пирокатехина и гидрохинона (по 1 мм 1% раствора на сосуд). Кроме обычных контрольных сосудов, в которые субстрат не вносился, мы ставили также контроль на возможное окисление добавленного субстрата предварительно прокипяченной тканью. Остаточное дыхание определялось также в аппарате Варбурга после добавления 0,005 N азиды натрия.

Определение суммарной дегидразной активности производилось по Тунбергу (по скорости обесцвечивания метиленовой сини). Активность пероксидазы определялась качественным гваяковым методом, активность каталазы — по методу Баха и Опарина.

Из ферментов группы карбогидраз нами определялась активность инвертазы, β -амилазы, цитазы и целлюлазы. Критерием активности служило увеличение количества редуцирующих сахаров при выдерживании растертой ткани в оптимальных условиях температуры и рН с добавлением соответствующего субстрата. Общая протеолитическая активность определялась по увеличению количества аминокислот, оттитровываемых спиртовой щелочью, после суточной инкубации растертой ткани при температуре 35° и рН 5,0; субстратом служила желатина.

Содержание аскорбиновой кислоты определялось титрованием 2,6-дихлорофенолиндофенолом навески материала, растертой с метафосфорной кислотой.

Из табл. I видно, что все исследованные нами виды микоризных грибов характеризуются чрезвычайно низкой активностью гидролитических ферментов. Протеолитическая активность в наших опытах не была обнаружена совсем. Активность карбогидраз в мицелии значительно превосходит таковую в плодовых телах. Эти наблюдения хорошо согласуются с тем, что плодовые тела, выполняя функцию выноса и распространения спор, растут за счет питательных веществ, поступающих из мицелия гриба и из корней высших растений. В культуральной жидкости не было обнаружено даже следов гидролитической активности. Незначительная активность углеводрасщепляющих ферментов у исследованных нами видов грибов связана, очевидно, с тем, что они образуют с корнем дерева

только эктотрофную и эктоэндотрофную микоризу и, следовательно, не проникают внутрь клетки. Таким образом, результаты наших наблюдений согласуются с представлениями о том, что основным источником углеродного питания микоризных грибов являются, по видимому, простые углеводы типа моносахаридов.

Таблица 1

Активность гидролитических ферментов плодовых тел и мицелия микоризных грибов (на 1 г сух. веса)

Фермент	Единицы измерения активности	Масленок		Белый гриб		Моховик
		плодов. тело	мицелий	плодов. тело	мицелий	плодов. тело.
β-амилаза	мг мальтозы за сутки	137,0	380,0	9,8	630,0	43,7
Инвертаза	мг глюкозы за сутки	18,7	150,0	10,4	0,0	0,0
Цитаза	То же	16,6	100,0	0,0	118,0	7,2
Целлюлаза	" "	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0
Протеазы	мг NH ₂ за сутки	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Большой интерес представляют данные, полученные при изучении окислительной системы грибов (см. табл. 2).

Таблица 2

Интенсивность дыхания и активность окислительных ферментов плодовых тел и мицелия микоризных грибов (на 1 г сух. веса)

	Единицы измерения активности	Масленок		Белый гриб		Моховик
		плодов. тело	мицелий	плодов. тело	мицелий	плодов. тело
Интенсивность дыхания	дл O ₂ /час	394,0	12030,0	477,2	7751,0	230,8
Аскорбиноксидаза	То же	0,0	0,0	91,5	0,0	0,0
Полифенолоксидаза:						
а) пирогаллол	" "	0,0	0,0	0,0	4169,5	202,0
б) пирокатехин	" "	0,0	0,0	0,0	6093,0	80,6
в) гидрохинон	" "	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Остаточн. дыхан.	% от общ.	100,0	0,0	42,0	79,3	62,5
Пероксидаза	Качеств. реакция	—	—	—	—	+
Каталаза	мг H ₂ O ₂ /час	298,0	6500,0	176,0	289,0	1488,0
Содерж. аскорбиновой кислоты	мг %	73,8	515,0	500,0	357,0	160,0

Следует прежде всего отметить, что интенсивность дыхания мицелия в 30—40 раз превышает интенсивность дыхания плодовых тел. И в этом случае сказываются свойственные мицелию интенсивный обмен веществ, процессы новообразования и роста, тогда как в плодовом теле после созревания спор жизнедеятельность резко ослабляется. В то же время интенсивность дыхания мицелия микоризных грибов в 5—15 раз слабее, чем уровень дыхательной активности у плесневых грибов (например, по сравнению с двухдневной культурой *Aspergillus niger*).

Обращают на себя внимание резко выраженные у микоризных грибов видовые различия ферментов завершающего этапа биологического окисления. Так, в плодовом теле белого гриба 40% общего дыхания катализируется ферментами, не подавляемыми азидом натрия (остаточное дыхание). Больше половины дыхания осуществляется за счет деятельности металлсодержащих ферментов, из которых у белого гриба нами

обнаружена одна только аскорбиноксидаза. Таким образом, последний этап дыхательного процесса осуществляет система аскорбиноксидаза — аскорбиновая кислота в сочетании с флавиновыми ферментами. Пероксидаза у этого объекта не обнаружена.

В мицелии белого гриба около 80% дыхания осуществляется флавиновыми ферментами, около 20% — металлсодержащими ферментами, которые в этом случае представлены полифенолоксидазой, окисляющей пирокатехин и пирогаллол. Пероксидаза, как и в плодовом теле, также не обнаружена; каталаза же мицелия белого гриба значительно более активна, чем этот фермент в плодовом теле.

Качественно иную систему дыхания мы обнаружили у масленка. Дыхание его полностью подавляется азидом натрия, из чего следует, что оно осуществляется за счет деятельности металлсодержащих ферментов. Однако все наши попытки идентифицировать ферменты, входящие в эту группу, оказались у этого объекта пока безрезультатными; вопрос этот требует дальнейших исследований. В противоположность мицелию, дыхание плодового тела масленка осуществляется лишь флавиновыми ферментами.

У третьего изучавшегося нами гриба, моховика, на долю флавиновых ферментов приходится около 60% общего дыхания плодового тела. Образуемая перекись водорода используется как каталазой, так и пероксидазой, которая здесь очень активна. Из использованных нами субстратов полифенолоксидаза моховика наиболее успешно окисляла пирогаллол и пирокатехин.

Ни у одного из изучавшихся нами объектов не была обнаружена дегидразная активность.

Из приведенных выше фактов видно, что биохимические различия между видами у микоризных грибов далеко превосходят все, что по этому поводу установлено у высших растений⁽³⁾. В отношении окислительных процессов эти различия имеют ярко выраженный качественный характер, что у высших растений обнаруживается только при сопоставлении гораздо более удаленных друг от друга форм (семейства, роды). Обращают также на себя внимание весьма существенные качественные различия окислительных систем мицелия и плодового тела одного и того же гриба. Такого рода различия между органами у высших растений также до настоящего времени не отмечались.

В заключение приносим глубокую благодарность Я. П. Худякову и Ю. М. Возняковской за предоставление нам для исследования мицелия чистых культур микоризных грибов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 X 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Р. Вильямс, Почвоведение, 1949. ² Я. П. Худяков, Тр. Комплексной научной экспедиции по вопросам полезащитного лесоразведения, 2, в. 2, 47 (1952); Ю. М. Возняковская, там же, стр. 161. ³ Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, Т. М. Иванова, Биохимия плодов и овощей, № 1 (1949); № 2 (1951). ⁴ E. Melin, Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza, 1925; Biochem. Zs., 75, No. 1—2 (1925); Symb. Bot. Ups., 8, No. 3 (1946). ⁵ J. E. How, Ann. Bot., 4, No. 1, 135 (1940). ⁶ G. Lindeberg, Physiologia plantarum, 1, No. 2, 196 (1948); Sv. Bot. Tidskr., 43, No. 2—3, 438 (1940); Physiologia plantarum, 5, No. 1, 100 (1952). ⁷ B. Norkrans, Symb. Bot. Ups., 11, No. 1 (1950). ⁸ E. Björkman, Symb. Bot. Ups., 6, No. 2 (1942); Sv. Bot. Tidskr., 38, No. 1, 1 (1944); 43, No. 2—3, 223 (1949). ⁹ O. Modess, Symb. Bot. Ups., 5, No. 1 (1941). ¹⁰ H. Belval, G. Legendre, C. R., 219, 525 (1944); Bull. Soc. Chim. Biol., 30, № 1—2, 62 (1948).