

К. А. КАРАПЕТЯН

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ
В ДВУЛЕТНИХ ПОБЕГАХ ПЕРСИКА

Целым рядом исследований установлено, что в условиях низких температур в растительном организме происходит ряд биохимических превращений, приводящих к повышению выносливости. При этом оказывается, что низкая температура влияет, в первую очередь, на активность и направленность действия ферментов [1—9]. Кроме того, работами А. Л. Курсанова и Н. Н. Крюковой [5], а также Б. А. Рубина и Н. М. Сисакяна [6] показано усиление гидролитической направленности инвертазы, амилазы и протеазы под влиянием низкой температуры. В результате, в разных органах растений происходит накопление более простых соединений.

Многие авторы считают, что в процессе зимовки растений основную роль играет обмен сахаров, который, поднимая концентрацию клеточного сока, понижает точку замерзания, с одной стороны, и защищает белки от коагуляции—с другой [10—11]. Кроме того, Левиттом [12] установлено, что сахара, соединяясь с белками, образуют комплекс мукопротеидов, которые довольно стабильны к низким температурам.

Другие исследователи, не отрицая роли сахаров в зимостойкости растений, вместе с тем, приоритет отдают воднорастворимым белкам и аминокислотам [13, 14].

Целью наших исследований (руководитель темы проф. В. О. Казарян) было выяснение изменения активности некоторых окислительных и гидролитических ферментов, а также количественное и качественное изменение пластических веществ в условиях пониженных температур у двулетних побегов персика (сорта Наринджи чгови).

Исходя из данных, полученных Д. Ф. Проценко и Л. К. Полищуком [15], Проценко [16], Э. Кеммером и Ф. Шульцом [17], согласно которым кора намного устойчивее к низким температурам, чем древесина, мы сочли целесообразным изучать их отдельно. При этом количественные и качественные изменения свободных и связанных сахаров и аминокислот определялись в коре и древесине, а активность ферментов и содержание SH-групп—только в коре.

Методика и содержание опытов соответствующих анализов. После завязывания плодов (21-у) от двулетних ветвей длиной 25—30 см из среднего яруса кроны брались черенки и разделялись на 4 группы*. Черенки I группы нижним срезом опускались в воду и оставлялись при

* Черенки взяты из совхоза № 15 Шаумянского района АрмССР.

комнатной температуре (20°), черенки II группы—в камеру с температурой 10° , III группы в холодильник с температурой 0° , IV группы также в холодильник, но при -5° . Экспозиция опытов 24 ч.

По истечении этого срока в одной части коры подопытных образцов определялась активность каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы, инвертазы, амилазы, протеазы, а также количество SH-групп. Остальная часть коры вместе с древесиной фиксировалась в вакуум-сушилке при $70-75^{\circ}$, для выявления количественного и качественного изменения свободных и связанных сахаров и аминокислот.

С целью выяснения степени повреждения с ветвей IV группы были сделаны тонкие срезы, которые затем окрашивались 0,25% нейтралкрасным. В результате было установлено более сильное повреждение древесной паренхимы от мороза по сравнению с тканью коры.

Определение активности каталазы проводилось методом Голдблита и Проктора [19], пероксидазы и полифенолоксидазы методом Самнера и Гессинга [20], с некоторыми изменениями [21]. Активность инвертазы определялась по количеству расщепленной глюкозы [22], амилазы—по методу Вильштеттера [23] и протеазы—по методу расщепленной аминокислоты, содержание SH-групп по методу Линена [24].

Методика получения хроматограмм заключалась в следующем: материал после сушки был хорошо измельчен и экстрагирован в 70% этаноловом спирте при $60-65^{\circ}$. Затем в экстракте с помощью Pb—ацетата осаждались белки. Фильтрат пропусклся через катионит (КУ-1) с целью освобождения от катионов и разделения сахара от аминокислот. Для удаления анионов раствор пропусклся через анионит (ЭДЭ-10П). Полученный раствор сахаров в кристаллизаторах помещался в вакуум-сушильник при $35-40^{\circ}$ и испарялся досуха. Осадок, растворенный в 10% изопропиловом спирте, служил для хроматографирования. Растворитель—бутанол+уксусная кислота+вода (4:1:5). Проявление хроматограмм производилось ацетоновым раствором анилин-фталата.

Для обнаружения кетоз полоски бумаг погружались в раствор МС. Аминокислоты, задержанные катионитом, элюировались 5N аммиаком, а элюат испарялся в вакуум-сушилке. Осадок растворялся в 10% изопропиловом спирте. Хроматограммы проявлялись в 0,25% ацетоновом растворе нингидрина, а для идентификации—в ацетоновом растворе изатина.

С целью получения гидролиза связанных сахаров, оставшийся осадок после спиртовой экстракции подвергался гидролизу на кипящей водяной бане, в $1\text{N H}_2\text{SO}_4$ в течение 6 ч. Гидролизат нейтрализовался гидратом окиси бария. Затем раствор отфильтровывался под вакуумом и пропусклся через катионит (КУ-1), а затем анионит ЭДЭ-10П. Для получения гидролизата нерастворимых белков, осадок, после получения связанных сахаров, подвергался гидролизу в $8\text{N H}_2\text{SO}_4$ в течение 24 ч. на кипящей водяной бане, затем нейтрализовывался гидратом окиси бария и отфильтровывался под вакуумом. Остальные процессы те же, что и у свободных аминокислот.

Количественное определение сахаров производилось по методу Хаггедорн-Иенсена, а азот—по методу Кельдаля.

По данным М. М. Окунцова и О. Ф. Аксеновой [4], в ходе закалки у озимой пшеницы полифенолоксидаза полностью теряет свою активность, в период раскаливания активность снова повышается, а пероксидаза показывает противоположную картину. Изучая различные по морозостойкости сорта пшеницы, Ньютон и Браун [18] установили, что активность каталазы изменяется с повышением морозостойкости. В опытах К. Т. Сухорукова и Г. Е. Барковской [1], проведенных с листьями лимона, апельсина и др. пород, показано, что в условиях пониженных температур активность пероксидазы и амилазы увеличивается. Это объяснение авторы связывают с отщеплением ферментов от сложных соединений плазмы и переходом в растворимое состояние. Аналогичные данные были получены Р. Г. Саакяном [3] у листьев виноградной лозы.

В наших опытах указанные выше ферменты изучались в условиях дифференцированной температуры. Активность пероксидазы (рис. 1)

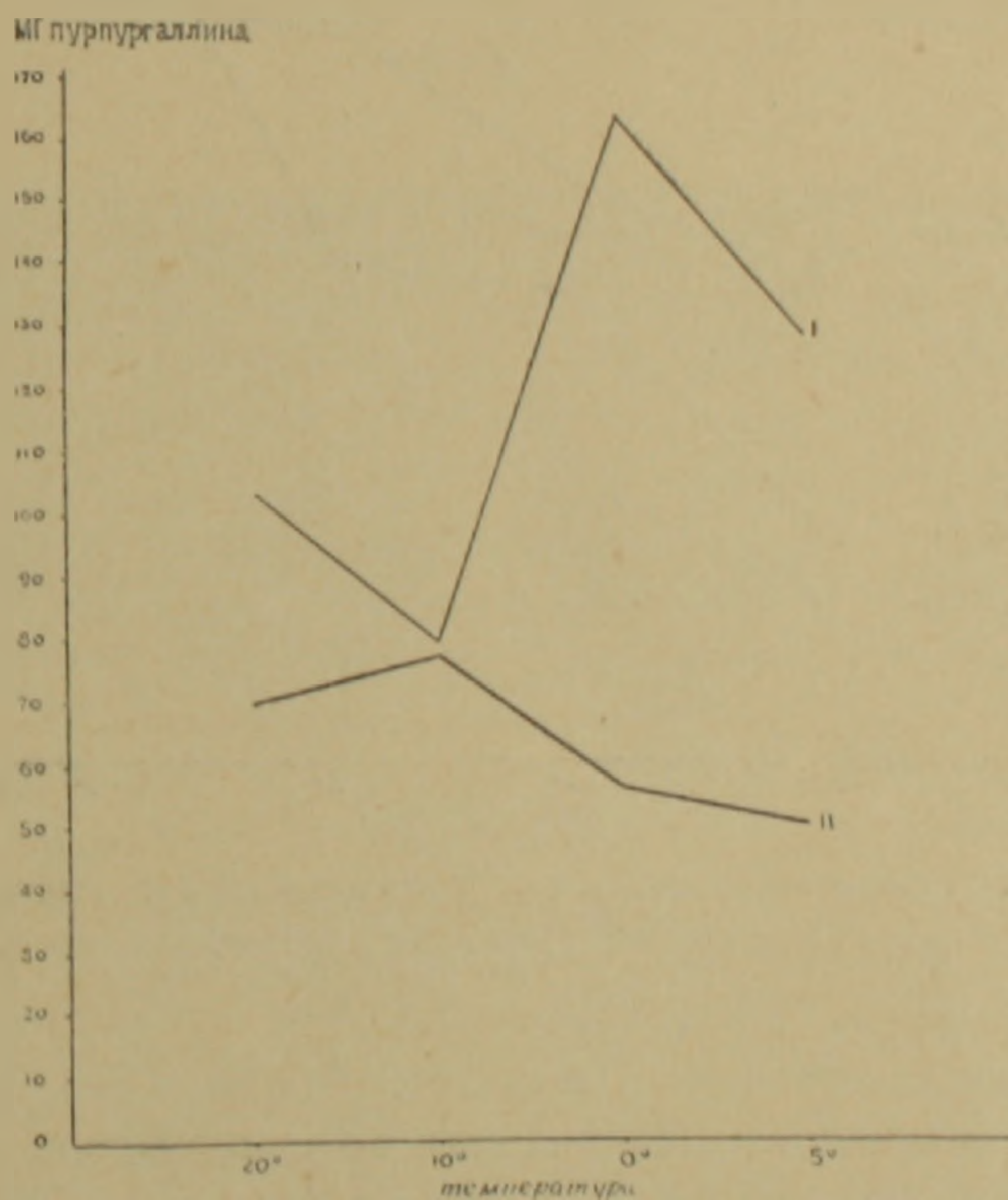


Рис. 1. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в мг пурпургаллина на 1 г ацетонового осадка. I — пероксидаза; II — полифенолоксидаза.

понижается при 10°, затем резко повышается после понижения температуры до 0°, а в дальнейшем (при —5°) снова понижается. При этом выясняется, что изменение активности полифенолоксидазы и пероксидазы диаметрально противоположно. Аналогичная картина наблюдается в отношении изменения активности каталазы.

Повышение активности указанных ферментов в условиях пониженных температур, по-видимому, следует рассматривать как защитную реакцию растений, а понижение активности пероксидазы при -5° , как результат повреждения тканей.

Параллельно с указанными анализами проводились также определения инвертазы, амилазы и протеазы.

Изменение гидролитической активности инвертазы и амилазы показало (рис. 2), что при пониженной температуре активность амилазы и инвертазы достигает максимума при -5°C , а активность протеазы ослабляется параллельно с понижением температуры (рис. 3), содержание же SH-групп уменьшается вплоть до 0°C , после чего увеличивается более резко, начиная с -5° (рис. 3).

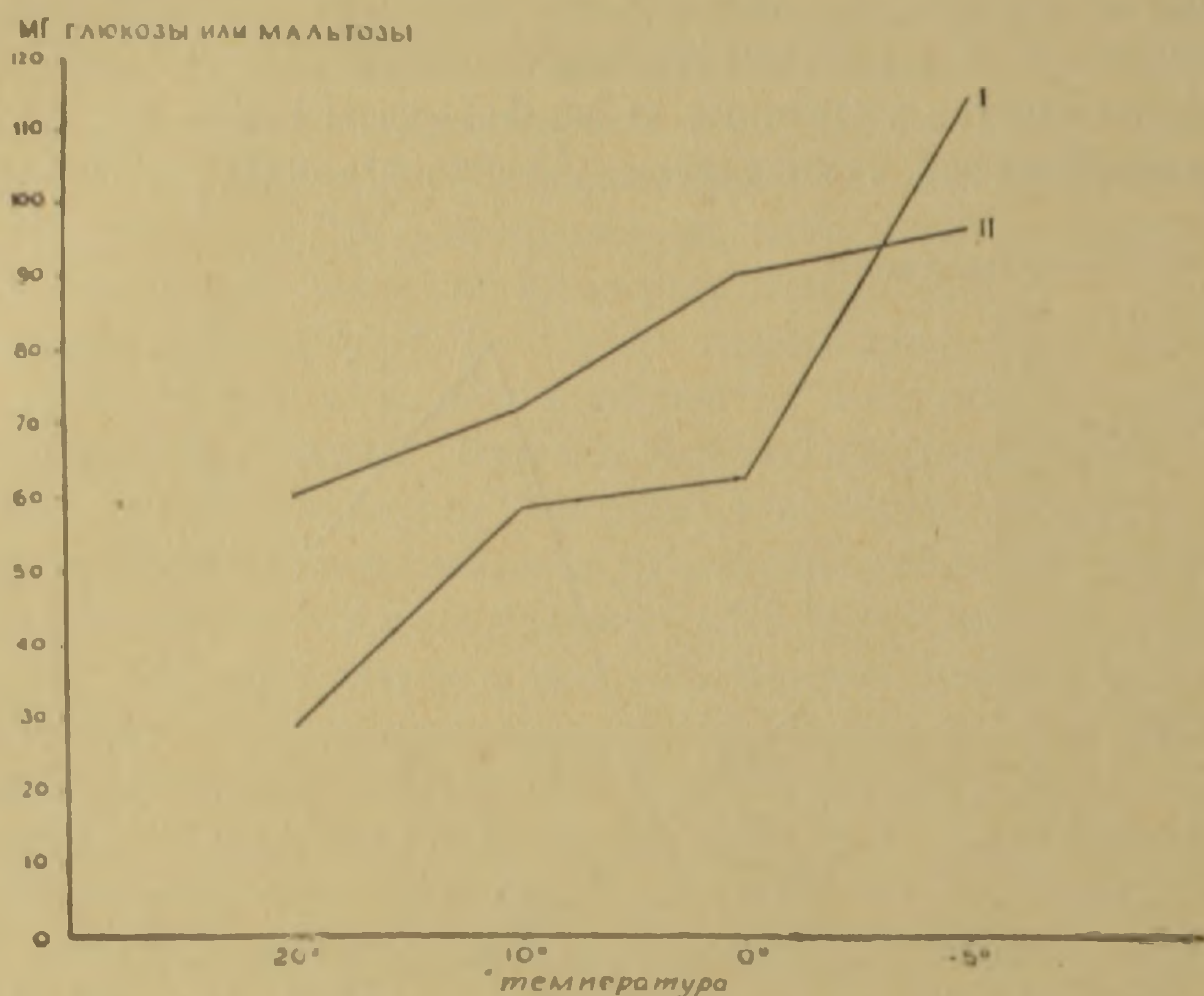


Рис. 2. Активность инвертазы и амилазы на 1 г сырого вещества в течение одних суток. I — амилаза; II — инвертаза.

Исходя из литературных данных о том, что в холодные времена года в тканях растений накапливаются в большом количестве растворимые сахара и аминокислоты. (Проценко и Полищук [15], Проценко [16], Шаффнит [13], А. В. Благовещенский и Г. А. Кирилова [25], Эйсен и Стюарт [26]), нами были также исследованы изменения состава углеводов и аминокислот. При этом непосредственной целью наших исследований в этом аспекте являлось выяснение количественных изменений сахаров и аминокислот, а также появление новых углеводов под влиянием пониженных температур.

Состав свободных сахаров в коре при разных температурах не подвергается изменению, а в древесине при -5° обнаруживается два новых сахара — мальтоза и ксилоза (рис. 4).

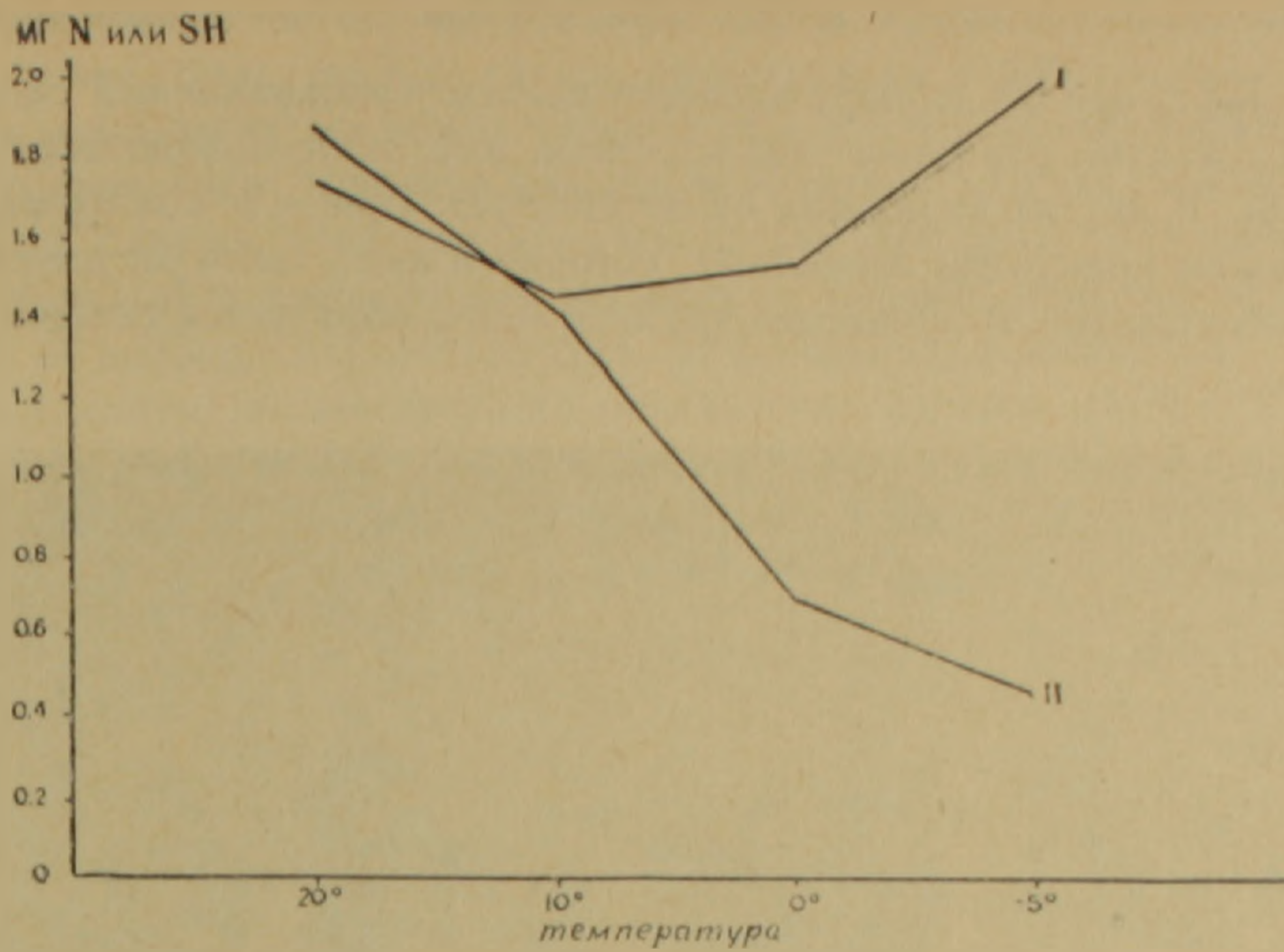


Рис. 3. Активность протеазы и количество сульфгидрильных групп в мг на 1 г сырого вещества. I — протеаза; II — сульфгидрильные группы.

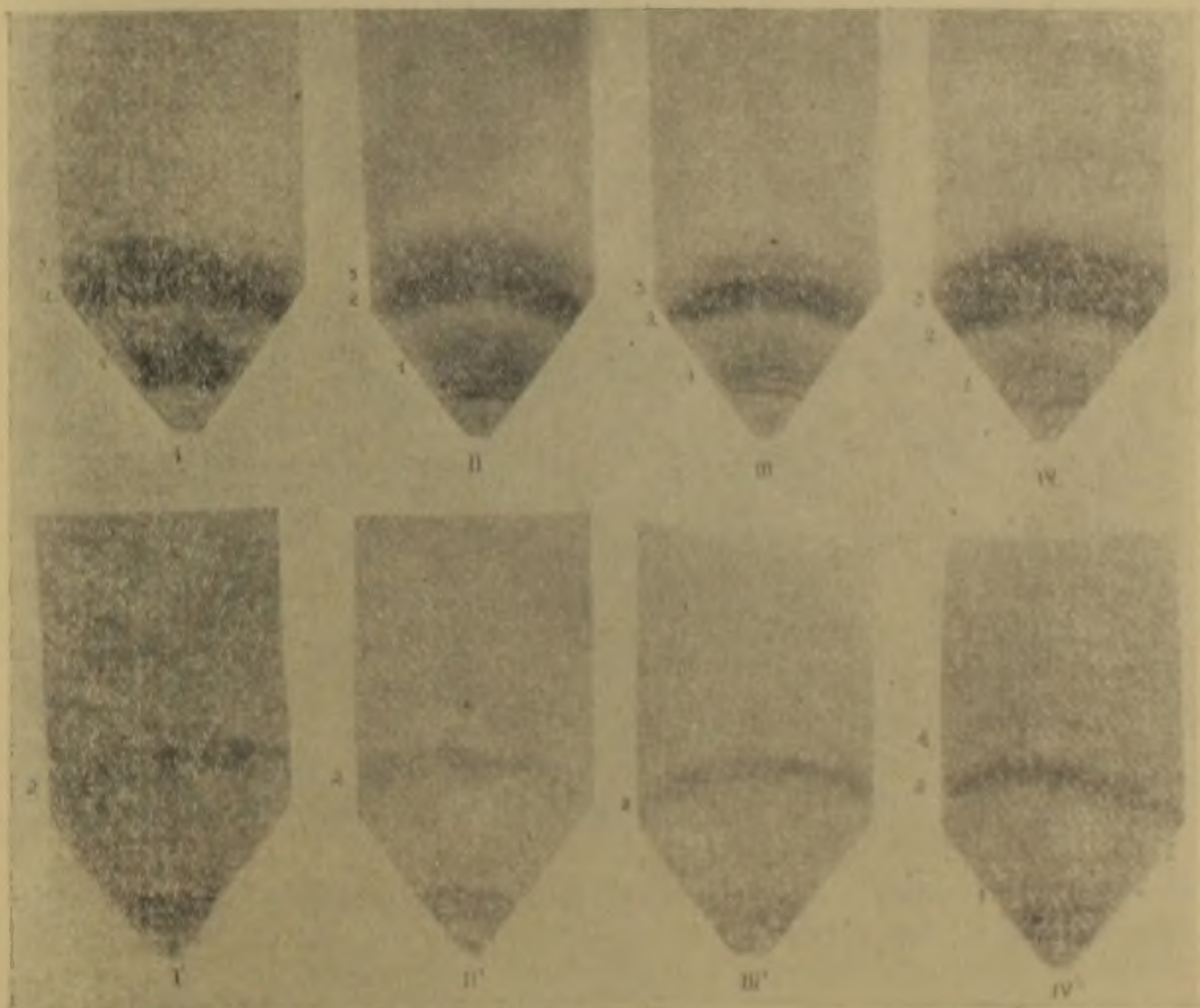


Рис. 4. Хроматограмма свободных сахаров при однодневном воздействии разных температур. I—IV — кора, I'—IV' — древесина, I, I' — (20°C); II, II' — (10°C); III, III' — (0°C); IV, IV' — (-5°C); 1—мальтоза, 2—глюкоза, 3—фруктоза, 4—ксилоза.

В коре, при 0°C обнаруживается неидентифицированный сахар, который с анили-фталатом дает красивый желтовато-оранжевый оттенок (рис. 5). В других вариантах он отсутствует. При -5° обнаруживается в большом количестве арабиноза, которая в иных температурных условиях отсутствует. В древесине при 0° и -5°C образуется сахар с таким

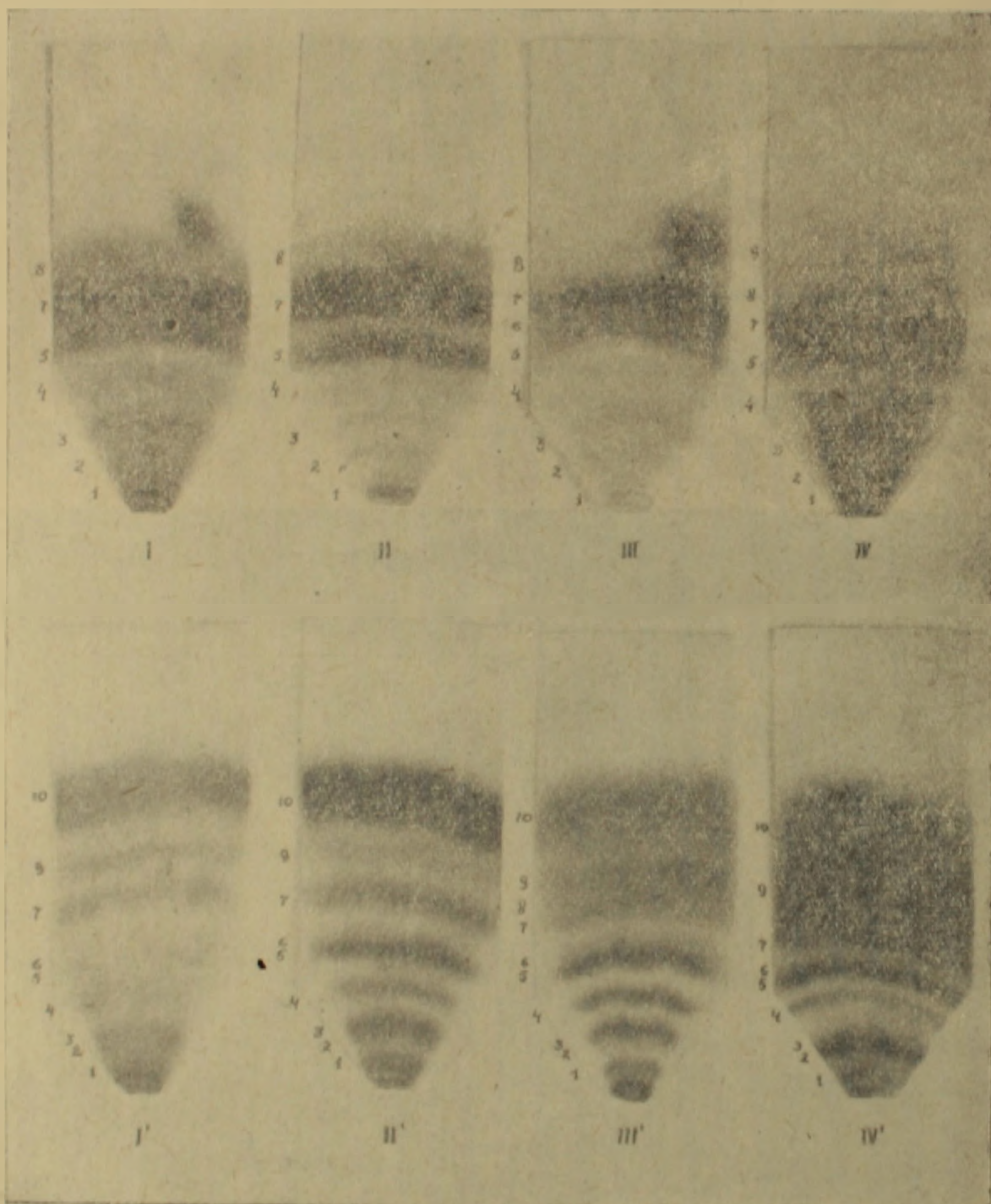


Рис. 5. Хроматограмма гидролизата связанных сахаров при однодневном воздействии разных температур. I, I' — (20°C). II, II' — (10°C). III, III' — (0°C). IV—IV' — (-5°C). (I—IV) — кора. 1 — глюкуроновая кислота; 2 — галактуроновая кислота; 3 — неидентифицированный пентозан; 4 — неидентифицированный пентозан; 5 — глюкоза; 6 — неидентифицированный сахар; 7 — ксилоза; 8 — арабиноза; 9 — рибоза. (I'—IV') — древесина. 1 — глюкуроновая кислота; 2 — галактуроновая кислота; 3 — неидентифицированный пентозан; 4, 5, 6 — неидентифицированный пентозан; 7 — глюкоза; 8 — неидентифицированный сахар; 9 — ксилоза; 10 — арабиноза.

же оранжевым оттенком, что и в коре. Далее, интересно то обстоятельство, что все обнаруженные сахара представляют собой альдозы.

Все показатели свидетельствуют о том, что в условиях низких температур происходят глубокие изменения в составе как свободных, так и связанных сахаров. При этом кора по составу свободных сахаров намного превосходит древесину, что, по нашему мнению, является одной из причин ее высокой морозостойкости по сравнению с последней.

Результаты количественного определения сахаров (табл. I) показали, что с понижением температуры до 0°C как в коре, так и в древесине увеличивается содержание редуцирующих сахаров. При -5°C их количество резко повышается. В этих условиях нам не удалось обнаружить сахарозу.

Таблица I
Содержание сахара в ветвях персика при разных температурах в ‰ на сухой вес

Температура (в °C)	К о р а					Д р е в е с и н а				
	редуциру- ющие сахара	мальтоза	общие ра- створимые сахара	нераство- римые са- хара	общая сумма	редуциру- ющие сахара	мальтоза	общие ра- створимые сахара	нераство- римые са- хара	общая сумма
20	1,83	0,56	2,39	4,22	6,61	0,35	—	0,35	2,68	3,03
10	1,97	0,58	2,55	4,70	7,25	0,38	—	0,38	4,96	5,34
0	1,84	0,40	2,24	3,72	5,96	0,44	—	0,44	4,61	5,05
-5	2,85	0,38	3,23	5,26	8,49	0,98	0,44	1,42	7,45	8,87

В коре наибольшее количество мальтозы отмечено при 0°C, а в древесине только при -5°C. Количество растворимых сахаров, по сравнению с контролем, нарастает при 10°C, при 0°C понижается, а затем вновь увеличивается при температуре -5°C. Примерно подобная закономерность наблюдается у нерастворимых сахаров.

При изменении свободных аминокислот в коре и в древесине (рис. 6) в коре не наблюдается заметного изменения, а в древесине при 0°C появляются две новые аминокислоты (цистеин+цистин и лизин), а при -5°C (цистеин+цистин). В составе связанных аминокислот коры (рис. 7) происходят более глубокие изменения. С понижением температуры уменьшается число аминокислот: при 0°C вместо 23 аминокислот, обнаруженных у контрольных побегов, проявляется 21. В древесине подобных изменений не наблюдается. Под влиянием пониженных температур увеличивается число свободных аминокислот, в то время как число связанных аминокислот, наоборот, уменьшается. Отсюда можно прийти к выводу, что увеличение свободных аминокислот осуществляется за счет связанных. Как отметили выше (рис. 3), несмотря на снижение гидролитической активности протеазы при низких температурах, мы

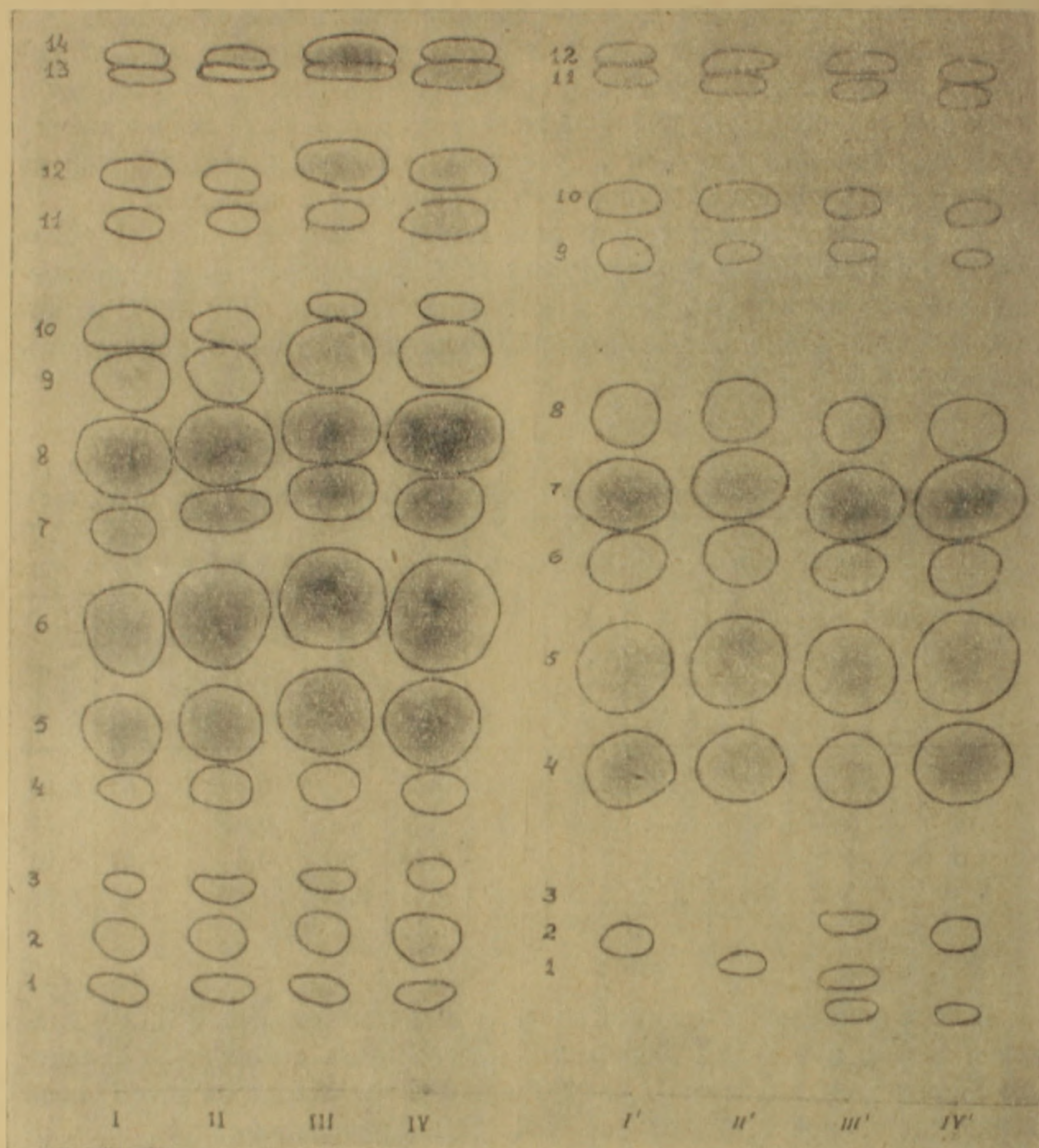


Рис. 6. Хроматограмма свободных аминокислот при однодневном воздействии разных температур. (I—IV) — кора. 1 — цистеин + цистин; 2 — орнитин; 3 — лизин; 4 — гистидин; 5 — аспарагин; 6 — глютамин; 7 — треонин; 8 — α -аланин; 9 — пролин + β -аланин; 10 — γ -аминомасляная кислота; 11 — триптофан; 12 — валин; 13 — фенилаланин; 14 — лейцины. (I—IV') — древесина. 1 — цистеин + цистин; 2 — орнитин; 3 — лизин; 4 — аспарагин; 5 — глютамин; 6 — треонин; 7 — α -аланин; 8 — пролин + β -аланин; 9 — триптофан; 10 — валин; 11 — фенилаланин; 12 — лейцины,

наблюдали увеличение числа и количества свободных аминокислот, что, по нашему мнению, объясняется падением отношения $\frac{\text{синтез}}{\text{гидролиз}}$.

Наряду с получением хроматограмм мы определяли также количество азота. Как видно из табл. 2, количество небелкового азота как в коре, так и в древесине увеличивается параллельно понижению темпе-

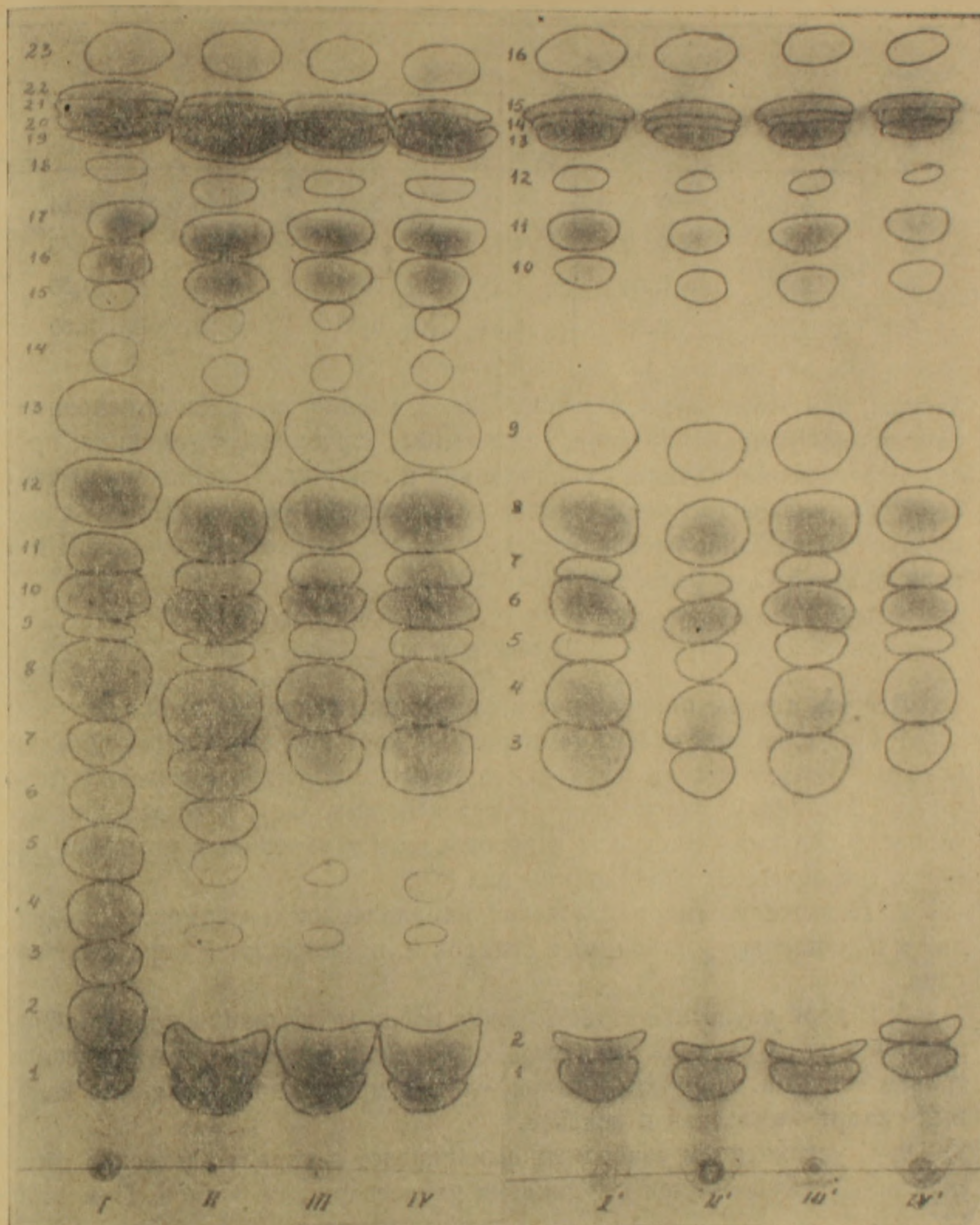


Рис. 7. Аминокислотный состав нерастворимых белков при разных температурах. (I—IV) — кора. 1— цистеин + цистин; 2 — орнитин; 3 — лизин; 4 — неидентифицированная аминокислота; 5 — гистидин; 6 — аргинин; 7 — аспарагин; 8 — серин. 9 — оксипролин; 10 — глютаминовая кислота; 11 — треонин; 12 — α -аланин; 13 — пролин + β -аланин; 14 — γ -аминомасляная кислота; 15 — тирозин; 16 — триптофан; 17 — валин; 18 — фенилаланин; 19 — неидентифицированная аминокислота; 20 — изолейцин; 21 — лейцин; 22, 23 — транслейцины. (I'—IV') — древесина. 1— цистеин + цистин; 2 — орнитин; 3 — аспарагин; 4 — серин; 5 — оксипролин; 6 — глютаминовая кислота; 7 — треонин; 8 — α -аланин; 9 — пролин + β -аланин; 10 — триптофан. 11 — валин; 12 — фенилаланин; 13 — изолейцин; 14 — лейцин; 15—16 — транслейцины.

Таблица 2

Содержание азота в ветвях персика при разных температурах в ‰ на сухой вес

Темпе- ратура (в °С)	К о р а			Д р е в е с и н а		
	белковый азот	небелковый азот	общий азот	белковый азот	небелковый азот	общий азот
20	0,89	0,34	1,33	0,45	0,15	0,61
10	0,81	0,42	1,23	0,38	0,17	0,55
0	0,75	0,50	1,25	0,32	0,23	0,55
-5	0,72	0,62	1,34	0,30	0,29	0,59

ратуры, при этом, как показывает рис. 6, увеличение идет, в основном, за счет орнитина, аспарагина, глутамина, треонина, α -аланина, пролин + β -аланина, валина, фенилаланина и лейцина. С понижением температуры количество белкового азота, наоборот, уменьшается. Максимальное содержание небелкового азота обнаруживается в древесине и в коре при -5°C , а белкового—при 20°C .

В ы в о д ы

Все эти данные привели нас к следующим основным выводам:

1. Под влиянием низких температур в коре двулетней ветви персика повышается активность ряда окислительных и гидролитических ферментов (каталаза, пероксидаза, инвертаза, амилаза). В отношении активности полифенолоксидазы и пероксидазы в указанных условиях обнаружена противоположная картина.

2. Повышение гидролитической направленности ферментов приводит к накоплению растворимых сахаров и аминокислот в коре и древесине.

3. В коре двулетней ветви персика после завязывания плодов обнаруживаются из сахаров мальтоза, глюкоза, фруктоза, а в древесине только глюкоза. При температуре -5°C в древесине появляются 2 новых сахара—мальтоза и ксилоза.

4. С увеличением свободных аминокислот в коре и древесине соответственно уменьшается содержание нерастворимых белков. При этом увеличение первых идет за счет гидролиза нерастворимых белков.

5. Под влиянием низких температур в коре накапливаются соединения со свободной группой SH.

6. Кора, в условиях пониженной температуры, по сравнению с древесиной, богаче пластическими веществами, чем и, по-видимому, объясняется ее высокая морозостойкость.

Կ. Հ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՑԱԾՐ ԶԵՐՄԱՍՏԻՃԱՆԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԵՂՁՆՈՒ ԵՐԿԱՄՅԱ
ԸՆՁՅՈՒՂՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Բազմաթիվ հետազոտողների կողմից հաստատված է, որ ցածր ջերմաստիճանի ազդեցության տակ բուսական օրգանիզմում տեղի են ունենում մի շարք բիոքիմիական փոփոխություններ, որոնց հետևանքով բույսերի տարբեր օրգաններում կուտակվում են մեծ քանակությամբ լուծվող շաքարներ և այլ նյութեր: Սակայն, շնայած դրան, մինչև այժմ դրականության մեջ քիչ տվյալներ կան այն մասին, թե ցածր ջերմաստիճանի անմիջական ազդեցության տակ ինչպիսի՞ շաքարներ կամ ամինոթթուներ են գոյանում ծառի կեղևում և բնափայտում:

Մեր նպատակն է եղել որոշել դեղձենու երկամյա ընձյուղներում մի քանի օքսիդացման և հիդրոլիտիկ ֆերմենտների ակտիվության, ինչպես նաև ածխաջրատների և սպիտակուցային նյութերի քանակական ու որակական փոփոխությունները տարբեր ջերմաստիճանների պայմաններում:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս մեզ պնդելու հետևյալ եզրակացությունները:

1. Ցածր ջերմաստիճանի ազդեցության տակ դեղձենու երկամյա ընձյուղների կեղևում բարձրանում է մի քանի օքսիդացման և հիդրոլիտիկ ֆերմենտների (կատալազա, պերօքսիդազա, ամիլազա, ինվերտազա) ակտիվությունը, մինչդեռ պոլիֆենոլօքսիդազայի և պրոտեազայի ակտիվությունը, ընդհանրապես, իջնում է:

2. Ֆերմենտների հիդրոլիտիկ ակտիվության բարձրացումը, ինչպես նաև սինթեզի անկումը կեղևում և բնափայտում բերում է լուծվող շաքարների ու ամինոթթուների կուտակման:

3. — 5°-ի պայմաններում բնափայտում հայտնվում են երկու նոր շաքարներ՝ մալտոզա և քսիլոզա, որոնք բացակայում են ջերմաստիճանային մյուս պայմաններում:

4. Ազատ ամինոթթուների ավելացման հետ մեկտեղ կեղևում և բնափայտում համապատասխանաբար պակասում է չլուծվող սպիտակուցների քանակը: Հետևաբար, ազատ ամինոթթուների ավելացումը տեղի է ունենում, չլուծվող սպիտակուցների հիդրոլիզի հաշվին:

5. Ցածր ջերմաստիճանի ազդեցության հետևանքով կեղևում կուտակվում են ազատ SH-խմբեր ունեցող միացություններ:

6. Կեղևը բնափայտի համեմատությամբ ավելի հարուստ է լուծվող նյութերով, որով և պայմանավորված է նրա բարձր ցրտադիմացկունությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сухоруков К. Т., Барковская Г. Е. Бюлл. Гл. бот. сада, 16, 1953.
2. Кокни А. Я. и Вилкова-Малышева А. Г. Биохимия плодов и овощей. Сб., 3, М., 1955.
3. Саакян Р. Г. Тр. Ин-та виноград. и винод. АН АрмССР, вып. 2, 1956.
4. Окунцов М. М. и Аксенова О. Ф. Тезисы докладов конференции по физиологии устойчивости растений. М., 1959.
5. Курсанов А. Л. и Крюкова Н. Н. Журн. Биохимия, т. 4, 5, 1939.
6. Рубин Б. А. и Сисакян Н. М. Сб. Проблемы биохимии в мичуринской биологии, 1949.
7. Абуталибов М. Г. ДАН Аз. ССР, т. 3, 5, 1947.
8. Мириманян В. А. Доклады Всесоюзн. акад. сельхоз. наук, вып. 9, 1956.
9. Благовещенский А. В. АН СССР, Докл. Всес. совещ. по физиол. раст., т. IV, в. 1, 1946.
10. Максимов Н. А. О вымерзании и холодостойкости растений. Избр. работы, т. 2, Изд. АН СССР, 1952.
11. Туманов И. И. Физиологические основы зимостойкости культурных растений. М., Сельхозгиз, 1940.
12. Levitt J. The role of carbohydrates in frost resistance. Rapp. et communs. Huitieme Congr. Internat. bot., Paris, sec. 11—12, 1954.
13. Schaffnit E. Studien über den Einfluss niedriger Temperaturen auf die pflanzliche Zelle. Mitt. d. K. W. Inst. f. Landw. in Bromberg, 3, 1910.
14. Копержинский В. В. Журн. Биохимия 4, вып. 4, 1939.
15. Проценко Д. Ф. и Полищук Л. К. О физиологических и биохимических особенностях морозостойкости плодовых культур. Изд. Киевского ун-та, 1948.
16. Проценко Д. Ф. Морозостойкость плодовых культур СССР, 1958.
17. Кеммер Э. и Шульц Ф. Проблема морозостойкости плодовых культур. Под. ред. И. И. Гунара, М., Изд. иностр. лит., 1958.
18. Newton R. a Brown W. Catalase activity of the wheat leaf juice in relation to frost resistance. Canad. J. agr. Res. 5, 1931.
19. Goldblith S. A. and Proctor B. E. Photometric determination of catalase activity. J. Biol. Chem. 187, 705, 1950.
20. Sumner J. B. and Gjessing E. C. Arch. Biochem. 2, 291, 1943.
21. Авунджян Э. С. Изв. АН АрмССР, (биол. науки), XII, 10, 1959.
22. Вальтер О. А., Пиневич Л. М., Варасова Н. Н. Практикум по физиологии растений с основами биохимии. Сельхозгиз, 1957.
23. Самнер Дж. Б. и Сомерс Ф. Г. Химия ферментов и методы их исследования. М., 1948.
24. Lynen F. Quantitative determination of sulphydryl groups, Ann. Bot. 574. 33, 1951.
25. Благовещенский А. В., Кирилова Г. А. ДАН АН СССР, 100, 1, 1955.
26. Asen Sam, Stuart Neil N. Effect of low temperature on the free amino acids of dormant Hydrangea macrophylla as revealed by paper chromatography. Proc. Amer. Soc. Hortlc. Sci, 71, 1958.