

<https://doi.org/10.3176/biol.1971.1.10>

УДК 581.13

В. ЯСКА

## О ВЛИЯНИИ ГУМАТОВ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ ОКСИДАЗЫ

Темноокрашенные органические вещества почвы — гумусовые вещества — влияют на разнообразные физиологические и биохимические процессы, протекающие в растениях (Кононова, 1963). В зависимости от концентрации и условий внешней среды они в различной степени способствуют росту и развитию растений, а в определенных условиях оказывают и неблагоприятное действие. Поэтому знание сущности и закономерностей действия гумусовых веществ на растение имеет большое практическое значение.

Несмотря на многочисленные работы механизм действия гумусовых веществ на растение вследствие его сложности и многогранности до сих пор остается нераскрытым. Многие исследователи (Бибер, Магазинер, 1951; Христева, 1955, 1957; Šmidova, 1960 и др.) установили, что в определенных условиях среды гумусовые вещества могут значительно усиливать дыхательные и энергетические процессы в тканях растений. Учитывая полифенольную природу значительной части химической структуры гумусовых веществ и наблюдаемое в опытах *in vivo* увеличение дыхания и активности некоторых дыхательных ферментов, Л. Христева (1955, 1957) и другие предположили, что первопричиной физиологического действия гуминовых кислот является их непосредственное участие в дыхательных процессах через воздействие на активность полифенолоксидазы и пероксидазы.

В настоящей работе изучалось влияние гуматов на активность растительных оксидаз в опытах *in vitro* для выяснения возможности непосредственной активации оксидаз гуматами.

### Материал и методика

Для приготовления ферментных экстрактов навеску измельченной ткани клубня картофеля (сорт 'Оденвальд'), а также корней и coleoptилей 4—5-дневных этиолированных проростков пшеницы (сорт 'Пиккер') растирали в предохлажденной ступке с песком и двух- или трехкратным в отношении навески объемом 0,25 М раствора сахарозы. Гомогенаты процеживали через плотный планктоновый шелк; для связывания эндогенных полифенольных соединений добавляли небольшое количество тонкого порошка активированного угля; после перемешивания в течение 10—15 мин на холоде смесь 20 мин центрифугировалась в рефрижераторной центрифуге при 18 000  $\times$  g. Полученные экстракты порциями по 1 мл хранились до определения ферментативной активности в замороженном виде при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Каждую порцию использовали для определения ферментативной активности только один раз, оттаивая и добавляя 2—4 мл дистиллированной воды.

Активность пероксидазы определялась колориметрически по скорости окисления субстрата гваякола в окрашенные соединения в присутствии экстракта и

$H_2O_2$  (Ponting, Joslyn, 1948). Стандартная инкубационная смесь общим объемом 5,0 мл состояла из 0,5 мл 0,01 М свежеприготовленного раствора гваякола, 2,0 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,2), 0,5 мл раствора испытуемого вещества (гумата), 0,5 мл 0,008 М  $H_2O_2$  и 0,2 мл в нужной степени разбавленного экстракта. Изменение оптической плотности измерялось на ФЭК-56 с синим светофильтром № 4 с интервалами в 30 сек в течение первых 3 мин.

Активность полифенолоксидазы измерялась колориметрически по скорости образования окрашенного продукта окисления пирокатехина под действием экстракта (Ponting, Joslyn, 1948). Стандартная инкубационная смесь общим объемом 5,0 мл состояла из 1,0 мл 0,01 М свежеприготовленного раствора пирокатехина, 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2), 0,5 мл раствора испытуемого вещества (гумата) и 0,2 мл подходяще разбавленного экстракта. Изменение оптической плотности измерялось на ФЭК-56 с темно-синим светофильтром № 3 с интервалами в 30 сек в первые 3 мин.

Активность ауксиноксидазы определялась спектрофотометрически по скорости разрушения 2-индоллилуксусной кислоты (ИУК) под действием экстракта (Gordon, Weber, 1951). Стандартная инкубационная смесь общим объемом 5,0 мл состояла из 1,0 мл 1 мМ ИУК, 1,0 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,1), 0,5 мл 1 мМ  $MnCl_2$ , 0,5 мл 1 мМ 2,4-дихлорфенола, 0,5 мл раствора испытуемого вещества (гумата) и 0,2 мл в нужной степени разбавленного экстракта. Через 5-минутные интервалы удалялись 1-миллилитровые объемы реакционной смеси и добавлялись в пробирки с 2,0 мл реактива Сальковского (0,01 М  $FeCl_3$  в 42%-ной  $HClO_4$ ). После перемешивания и выдерживания в темноте в течение не менее чем 30 мин измерялась оптическая плотность на спектрофотометре СФ-4А при 525 мк. Количество разрушенной ИУК определялось по калибровочному графику.

Предварительные опыты показали, что совместное присутствие в инкубационной смеси кофакторов  $Mn^{++}$  и 2,4-дихлорфенола необходимо для проявления ауксиноксидазной активности. При наличии лишь  $Mn^{++}$  активности не наблюдалось, а при добавлении 2,4-дихлорфенола без  $Mn^{++}$  проявлялась лишь относительно слабая активность. Устранение лаг-фазы достигалось удалением из растительных гомогенатов эндогенных полифенольных соединений путем обработки экстрактов активированным углем, как предложено Г. Янссоном (Jansson, 1962).

Гуминовые кислоты осаждались из экстрактов низинного и переходного торфа в 0,1 н. NaOH, а также из водных вытяжек стерильных наростов трутового гриба (чаги) *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. подкислением соляной кислотой до рН 1—2. Осадки очищались переосаждением соляной кислотой из щелочного раствора. Гели гуминовых кислот дегидратировались замораживанием при  $-10^{\circ}C$ , а после оттаивания фильтровались на воронке Бюхнера, осадок промывался небольшим количеством 5 мМ холодной соляной кислоты.

Для получения препарата натриевой соли осадок гуминовой кислоты растворяли в возможно меньшем объеме 0,5 н. NaOH. Нерастворимая часть отделялась центрифугированием, и надосадочный раствор вливался при перемешивании в 5—6-кратный объем 95%-ного этилового спирта. После выдерживания на холоде в течение 15—20 мин осадок гумата натрия фильтровался на воронке Бюхнера, промывался небольшими порциями спирта и высушивался на воздухе до исчезновения запаха спирта. Полученные препараты гуматов хорошо и полностью растворяются в воде.

## Результаты и обсуждение

Опыты показали, что добавление в инкубационные смеси натриевых солей гуминовых кислот из низинного и переходного торфа, а также из отростков чаги в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-2}\%$  не оказывало ни заметного подавляющего, ни активирующего действия на пероксидазную активность экстрактов из корней этиолированных проростков пшеницы и на полифенолоксидазную активность экстрактов из клубней картофеля.

Полифенолоксидазная активность в экстрактах из корней проростков пшеницы отсутствовала, не выявлялась она и после добавления гуматов. Таким образом, наблюдаемое в опытах *in vivo* усиление дыхания растительных тканей под воздействием гуматов не обусловлено их непосредственным воздействием на активность полифенолоксидазы или пероксидазы.

Учитывая, что фенольные соединения в зависимости от химической природы являются либо активаторами, либо ингибиторами ауксиноксидазы (см. Родионова, 1965), то интересно испытать действие гуматов и на этот фермент, который, по-видимому, играет важную роль в ауксиновом обмене и процессе роста растений. Опыты показали, что в концентрации  $10^{-4}\%$  гуматы не оказывали существенного действия и на ауксиноксидазную активность экстрактов из корней и coleoptилей проростков пшеницы. При концентрации  $10^{-3}\%$  в различной степени в зависимости от природы гумата выявилось подавление ауксиноксидазной активности. При этом гумат из наростов чаги оказался более сильным ингибитором, чем гуматы из торфа. Степень подавления, однако, постепенно уменьшалась с увеличением времени инкубирования реакционной смеси от 5 до 30 мин.

Из испытанных мономерных фенольных соединений *o*-дифенолы гваякол ( $1 \times 10^{-4}$  М) и кофейная кислота ( $5 \times 10^{-5}$  М) в концентрациях около  $10^{-3}\%$  полностью подавляли ауксиноксидазную активность, которая уже не наблюдалась даже после продолжительного инкубирования. В сырых экстрактах, не обработанных активированным углем, при действии эндогенных ингибиторов наблюдалась 10-минутная лаг-фаза, а затем — частичное подавление активности. Сравнение показывает, что гуматы являются относительно более слабыми ингибиторами ауксиноксидазы, чем мономерные *o*-дифенолы и эндогенные ингибиторы, вызывая лишь частичное и неустойчивое подавление активности.

При рассмотрении полученных данных следует учитывать, что механизм действия гуминовых кислот на растение существенным образом зависит от того, в какой форме они проникают в ткань: в интактной макромолекулярной форме или после предварительного расщепления на низкомолекулярные структурные единицы. Хотя и выявлено медленное и ограниченное проникновение радиоактивности меченых  $C^{14}$ -гуматов в корни (Prat, Prospišil, 1959), пока нет достоверных данных о форме и размерах молекул гуминовых кислот, проникающих в клетки. Исследования В. Фляйга (Flaig, 1965) показали, что гуматы оказывали на растение одинаковое действие независимо от того, вводились они непосредственно в питательный раствор или были отделены полупроницаемой мембраной. Следовательно, на растение влияли не макромолекулы гумата, а низкомолекулярные продукты распада. В то же время достоверно установлено (Чижевский, Дикусар, 1955; Guminska и др., 1962; Baduga, 1965 и др.), что макромолекулы гумусовых веществ благодаря ионообменным и комплексообразовательным свойствам воздействуют на растение косвенно — путем создания благоприятной внешней среды. Таким образом, действие гуматов в кратковременных биохимических опытах *in vitro* и в продолжительных вегетативных опытах *in vivo* может оказаться различным.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бибер В. А., Магазинер К. М., 1951. О влиянии гуминовых и фульвовых кислот на дыхание изолированных растительных тканей. Докл. АН СССР 76: 609—612.  
Кононова М. М., 1963. Органическое вещество почвы. М.

- Родионова Н. А., 1965. О ферментативном разрушении  $\beta$ -индолилуксусной кислоты. Усп. совр. биол. **60** : 321—335.
- Христева Л. А., 1955. Участие гуминовых кислот и других органических веществ в питании высших растений и агрономическое значение этого вида питания. Изв. АН СССР, сер. биол. (4) : 58—83.
- Христева Л. А., 1957. Физиологическая функция гуминовой кислоты в процессах обмена веществ высших растений. В сб.: Гуминовые удобрения. Харьков : 95—108.
- Чижевский М. Г., Дикусар М. М., 1955. Роль гумуса и микроорганизмов в корневом питании высших растений в условиях водных и песчаных культур. Изв. ТСХА (2) : 173—192.
- Badura L., 1965. O mechanizmie «stymulujacego» wplywu humianu sodu na process fermentacji alkoholowy i rozmnazanie drozdzy. Acta Soc. Bot. Polon. **34** : 287—328.
- Flaig W., 1965. Action des produits de dégradation de la lignine sur la métabolisme végétal. Mecanisme possible de cette action. C. r. Acad. agric. France **51** : 1118—1183.
- Gordon S. A., Weber R. P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid, Plant Physiol. **26** : 192—195.
- Guininska Z., Guminski S., Badura L., 1962. Über die direkte und indirekte Wirkung der Humusverbindungen auf den pflanzlichen Organismen. Vorläufige Mitteilung. Acta Soc. Bot. Polon. **31** : 265—268.
- Jansson G., 1962. Some properties of a substance in barley seeds which induces a lag period in the enzymic oxidation of 3-indoleacetic acid. Arkiv. kemi **19** : 161—171.
- Ponting J. D., Joslyn M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Arch. Biochem. **19** : 47—64.
- Prat S., Prospišil F., 1959. Humic acids with  $C^{14}$ . Biol. Plant. **5** : 265—270.
- Smidova M., 1960. The influence of humic acid on the respiration of plant roots. Biol. Plant. **2** : 152—164.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
3/XII 1969

V. JAASKA

## HUMAATIDE TOIMEST TAIMEOKSÜDAASIDELE

### Resümee

Turbast ja kasekäsna *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. steriilsetest kasvudest eraldatud naatriumhumaatide  $10^{-4}$ ...  $10^{-2}\%$ -lised kontsentratsioonid ei mõjutanud etioleeritud nisutõusmete juureekstraktide peroksüdaasest ja kartulimugula ekstraktide polüfenool-oksüdaasest aktiivsust. Nisutõusmete juurte- ja koleoptiilikstraktide auksiinoksüdaasest aktiivsusele humaatide  $10^{-4}\%$ -lised kontsentratsioonid ei mõjunud, kuid  $10^{-3}\%$ -lised kontsentratsioonid inhibeerisid seda erineval määral, olenevalt preparaadi päritolust ja reaktsiooni kestusest.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saabunud  
3. XII 1969

V. JAASKA

## ON THE EFFECT OF HUMATES ON PLANT OXIDASES

### Summary

Sodium humates from peat and sterile outgrowths of a fungus *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. at  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-20}\%$  exhibited no effect on the peroxidase activity in extracts from roots of etiolated wheat seedlings, as well as on the polyphenoloxidase activity in extracts from potato tubers. At  $10^{-40}\%$ , humates caused no effect on the auxinoxidase activity in extracts from roots and coleoptiles of wheat seedlings, whereas at  $10^{-30}\%$  they inhibited the activity in a different degree, in dependence on the origin of the humate and the reaction time.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
Dec. 3, 1969