

5-1
А 59
АКАДЕМИЯ НАУК СССР
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. В. Л. КОМАРОВА

На правах рукописи

Т. И. ИГОШИНА

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЦИНКА В ХЛОРОПЛАСТАХ В СВЯЗИ С ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛЬЮ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация написана на русском языке
(Специальность 03.101 — Физиология растений)

ЛЕНИНГРАД
1972

На правах рукописи

Т. И. ИГОШИНА

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЦИНКА
В ХЛОРОПЛАСТАХ В СВЯЗИ
С ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛЬЮ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация написана на русском языке
(Специальность 03.101 — Физиология растений)

ЛЕНИНГРАД

1972

ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

УЧЕБНО-НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

57 58

СК

А 59

АН СССР

Работа выполнена в лаборатории микроэлементов Ботанического института им. В. Л. Комарова АН СССР.

Научный руководитель — кандидат химических наук А. В. Косицын.

Диссертация изложена на страницах машинописного текста, иллюстрирована таблицами и рисунками.

Официальные оппоненты:

Доктор биол. наук, профессор Е. А. Бойченко.

Доктор биол. наук, профессор Д. И. Савожианков.

Отзыв дан Биологическим институтом Ленинградского Государственного Университета им. А. А. Жданова.

Диссертация принята к защите Ученым Советом Ботанического института им. В. Л. Комарова АН СССР 28 февраля 1972 г.

Автореферат разослан 17 марта 1972 г.

Защита состоится 17 апреля 1972 г.

Просим присылать Ваши замечания по адресу: 197022, г. Ленинград П-22, ул. проф. Попова 2, Ботанический институт им. В. Л. Комарова АН СССР, Ученому секретарю.

Центральная научная библиотека Академии наук Кировской ССР

В настоящее время абсолютная необходимость цинка для нормального развития и жизнедеятельности растений не вызывает сомнений. Недостаток цинка ведет к нарушению процессов роста и развития, различным болезням и морфологическим изменениям растений (Reed, 1946; Thomson a. Weier, 1962; Hewitt, 1963). Результаты многочисленных исследований показывают, что цинк принимает участие во всех важнейших процессах метаболизма растений: в азотном обмене (Possingham, 1956; Naik a. Asava, 1961; Давыдова, 1966; 1967 и др.), в фосфорном обмене (Парибок и Кузнецова, 1963; Парибок и Алексеева-Попова, 1965; Парибок, 1970 и др.), в дыхании растений (Quinlan-Watson, 1953; Medina a. Nicholas, 1957; Парибок, 1970), но механизм участия цинка в этих процессах почти не исследован.

В высших растениях обнаружены почти все ферменты, необходимость цинка для активности которых доказана на животных объектах (Cossins a. oth., 1968; Habig a. Racusen, 1968; Leblova and oth., 1970 и др.), но наличие цинка и специфичность его доказаны только для двух ферментов из растений — алкогольдегидрогеназы из семян арахиса (Pattee a. Swaisgood, 1968) и карбоангидразы из листьев петрушки (Tobin, 1970).

Концентрация цинка в определенных структурах может указывать на необходимость его для процессов, происходящих в них, а выяснение форм связи цинка с веществами клетки может способствовать более глубокому пониманию физиологической роли цинка. Однако, относительно внутриклеточного распределения цинка общего мнения нет. По данным ряда исследователей (Власюк и др., 1963; 1964; Вечер и др., 1970), высоким содержанием цинка отличаются хлоропласты сахарной свеклы, шпината, гороха. В то же время исследования, проведенные на томатах, а также на горохе показали преобладание цинка в митохондриях (Косицын и Игошина, 1964; Реслер, 1967). Очень много цинка содержится в вакуолярном соке (Косицын, 1965).

Наличие прочной связи цинка с белками хлоропластов и митохондрий из листьев гороха, показанное Реслер (1967), и большого разнообразия ферментных систем в этих структурах позволяют предполагать, что среди белков этих структур есть и цинк-содержащие белки-ферменты.

Основной целью нашей работы было изучение состояния цинка в хлоропластах томата и связи его с белками, в особенности. В работе исследовалась прочность связи цинка с белками хлоропластов, содержание в них цинка, электрофоретическое поведение цинк-содержащих белков, связь цинка с липидными веществами хлоропластов и влияние недостатка цинка в растении на эти характеристики. Исследовался также цинк митохондриальной фракции, но результаты этой серии опытов менее определены, так как не существует надежных методов очистки этой фракции от фрагментов хлоропластов.

Методы исследования

Исследования проводились на томатах (*Lycopersicon esculentum* L.) сортов «Грибовские грунтовые» (I серия опытов) и «Талалихино» (II серия опытов). Томаты выращивались в водной культуре на питательном растворе Арнона в двух вариантах: —Zn и +Zn. В первой серии опытов растения варианта —Zn получали 5 мкг цинка на литр питательного раствора, варианта +Zn — 50 мкг цинка на литр. В растворы обоих вариантов добавляли 50 мккюри/л Zn^{65} . Во II серии опытов растения варианта —Zn совсем не получали цинка, вариант +Zn получал 50 мкг цинка/литр и кроме того, в растворы обоих вариантов вносили 150 мккюри/л Zn^{65} без носителя. Питательные растворы готовили на бидистиллированной воде из очищенных дитизоном солей, и при выращивании растений принимали все меры предосторожности против загрязнения их посторонним цинком. Для анализа снимали листья 3—7-го яруса с 23—40-дневных растений, когда на растениях варианта —Zn появлялись первые признаки недостаточности цинка.

Выделение хлоропластов и растворимых белков. — В I серии опытов хлоропласты и митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием по методу, в основе которого находятся сведения из работ Холм-Хансена и сотр. (Holm Hansen a. oth., 1959), Мосоловой и Сисакяна, 1961; Семихатовой и Бушуевой, 1963. Свежесобранные листья растирали в ступке с равным объемом буфера следующего состава: 0,2 М трис-НСI, 0,3 М сахароза, 0,005 М ЭДТА и 0,2% Na_2SO_4 .

pH раствора 7,4—7,6. Из отжатого через ткань гомогената осаждали крупные частицы при 130xg — 10 мин и затем митохондрии при 7000xg. Для получения хлоропластов осадок 1300xg ресуспендировали в промывном растворе, тяжелые частицы осаждались в течение 10 мин при 350xg и хлоропласты 10 мин при 130xg. Осадки структур промывали 0,01 М трис-НСI буфером с 0,3 М сахарозой и 0,2% сульфата натрия при соответствующих ускорениях. Полученная таким путем фракция митохондрий была сильно загрязнена фрагментами хлоропластов, а хлоропласты были сильно разрушены.

Во II серии опытов разрушительно действующий на хлоропласты томатов трис-НСI буфер (Blumenthal-Goldschmidt a. Poljakoff-Meiber, 1966) был заменен фосфатным буфером—0,2 М, pH 7,8 с добавкой 0,5 М сахарозы, 0,4% Na_2SO_4 и различных количеств ЭДТА (концентрация хелатирующего агента составляла в разных опытах от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-2}$ М). Хлоропласты выделяли центрифугированием при 1200xg в течение 10 мин после предварительного отделения тяжелых частиц 10-минутным центрифугированием при 200xg, Гомогенат и супернатант перед центрифугированием подслаивали 0,5 М сахарозой.

Промытые осадки хлоропластов подвергали осмотическому шоку путем суспендирования в дистиллированной воде. Суспензию настаивали 1 час при $t + 2^\circ$ с постоянным перемешиванием и растворимые белки отделяли 20-минутным центрифугированием при 15000xg. Эту операцию повторяли три раза и надосадочные растворы объединяли. В I серии опытов растворимые белки экстрагировали сразу трис-аскорбатным буфером с pH 9,0 по методу Персона и Циппера (Person a. Zipper, 1965). В опытах по изучению влияния недостатка цинка в растениях на фракционный состав растворимых белков хлоропластов (1968—1969 гг.) растворимые белки экстрагировали последовательно двумя порциями дистиллированной воды (I и II водные экстракты) и трис-аскорбатным буфером (Т—А экстракт).

Все растворы белков диализовали против трис-фосфатного буфера с pH 6,8, в течение 16—20 часов при $t + 2^\circ$. В некоторых случаях низкомолекулярные примеси отделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G —25.

Во всех экстрактах и суспензиях определяли белок по микрометоду Кьельдаля или по микробиуретовому методу (Itzhaki a. Gill, 1964) и содержание цинка — по радиоактивности.

Диск-электрофорез растворимых белков хлоропластов и обработка электрофореграмм.— Электрофоретическое фракционирование растворимых белков производили по методу Стюарда и сопр. (Steward a. oth., 1965) и Сафонова и Сафоновой (1969), за исключением I серии опытов, когда полимеризацию мелкопористого геля производили фотохимическим способом с рибофлавином в качестве катализатора. Для предотвращения смешивания белкового раствора с электродным буфером плотность раствора увеличивали добавлением к нему сахарозы до 20% конечной концентрации.

Диск-электрофорез проводился в течение 2—2,5 часов при силе тока 2 мА на трубку.

На каждый вариант опыта ставили 6—8 гелевых столбиков. После окончания электрофореза гели вынимали из трубок, измеряли положение фронтальной зоны и половину столбиков каждого варианта окрашивали в течение 1,5 часов в 1% растворе амидошварца 10 В. Избыток краски удаляли многократной промывкой гелевых столбиков 1% раствором CH_3COOH . Затем электрофореграммы зарисовывали, фотографировали и денситометрировали на микрофотомере МФ-2. Остальные гелевые столбики разрезали на секции шириной 1—1,5 мм, которые подсушивали на кружочках фильтрованной бумаги, и затем измеряли радиоактивность каждой секции.

В опытах по изучению влияния цинка на белковый состав хлоропластов, которые проводились без применения радиоактивного цинка, денситограммы анализировали специально разработанным нами способом разложения суммарной кривой оптической плотности на отдельные белковые фракции. Подобный способ анализа денситограмм описан Бесемером и Клаусом (Besemer u. Clauss, 1968).

Определение цинка.— Определение содержания цинка в листьях производили дитизионовым методом (Пейве, 1959; Wolff, 1954). Эти данные использовали для определения удельной активности цинка-65 в каждом опыте. Для этого в определенной части пробы листьев с известным содержанием цинка определяли удельную активность цинка-65 в имп/мин на микрограмм цинка, которую затем использовали для вычисления содержания цинка в различных его соединениях. Измерения радиоактивности суспензий хлоропластов, белковых экстрактов, ламеллярных белков и проб листьев, взятых для определения удельной активности, производили на радиометре «Б-2» или «Волна» с торцовым счетчиком МСТ-17. Радиоактивность секций геля, пигментных зон на хроматограмме и

спирт-ацетонового и петролейно-эфирного экстрактов измеряли на сцинтилляционном гамма-радиометре. Все измерения проводили в строго идентичных условиях, сравнивая радиоактивность проб с радиоактивностью эталонов. Для тех случаев, когда нельзя было использовать равные объемы измеряемых растворов или пробы одинакового веса, строили поправочные графики, учитывающие самопоглощение бета-излучения цинка-65 в зависимости от толщины поглощающего слоя.

Выделение пигментов и липидов.— Остатки хлоропластов после экстракции из них растворимых белков обрабатывали последовательно смесью ацетона с этиловым спиртом (3:1) и петролейным эфиром. Пигменты разделяли хроматографией на бумаге по методу Сапожникова, Маевской и Поповой (1959). Измеряли радиоактивность и рассчитывали содержание цинка в зонах пигментов, спирт-ацетоновом экстракте, петролейно-эфирном экстракте и нерастворимых остатках. В спирт-ацетоновом экстракте определяли содержание хлорофилла на ФЭК-56 за красным фильтром.

Статистическую обработку данных производили согласно руководству Бейли (1964) и Вознесенского (1969).

(РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

Содержание цинка в листьях томатов.— Во всех летних опытах растения варианта —Zn проявили отчетливые признаки недостаточности цинка: отставание в росте, потемнение и скручивание листьев, замедление роста боковых корней. У растений, оставленных для контроля за развитием недостаточности, появились некрозы на листьях и черешках. Сроки проявления признаков недостаточности цинка сильно зависели от погоды. В жаркие солнечные дни растения начинали проявлять болезненные симптомы гораздо раньше, чем в прохладные дни. У цинк-дефицитных растений значительно снижался вес листьев и содержание цинка в растениях. Листья варианта —Zn содержали в среднем ($M \pm m$) 24 ± 1 мкг Zn/г сухого веса, варианта +Zn— 58 ± 3 мкг/г сухого веса. Разница между вариантами достоверна ($t_d > t$).

Связь цинка с белками в хлоропластах, их фрагментах и митохондриях томатов.— Для исследования связи цинка с белками этих структур необходимо было проверить возможность нахождения в них низкомолекулярных форм цинка. Суспензию, представлявшую собой фрагменты хлоропластов с примесью митохондрий, перемешивали в 0,25% растворе

додецилсульфата натрия и затем диализовали. Параллельно шел диализ интактной суспензии. Пробы на измерение радиоактивности брали через 4 часа. Оказалось, что суспензия этих структур практически не содержит легкорастворимого низкомолекулярного цинка. Можно было предполагать, что весь цинк этих структур связан с белками.

Между содержанием цинка в белках структур и общим содержанием его в листьях томатов наблюдается определенная корреляция. С уменьшением количества цинка в листе (C_A) содержание его в белках структур (C_F) почти не меняется. Вследствие этого отношение C_F/C_A имеет тенденцию к росту при снижении содержания цинка в листьях. Это отношение всегда больше 1,0 при содержании цинка в листе менее 40 мкг/г веса. При больших количествах цинка в листе отношение C_F/C_A больше единицы. Эти результаты указывают на необходимость белкового цинка для внутриклеточных структур, так как он удерживается в них и при общем недостатке цинка в растении.

Определение содержания цинка в белках хлоропластов показало, что растворимые белки хлоропластов содержат довольно много цинка (табл. 1).

Таблица 1

Содержание цинка в белках хлоропластов		
Вариант	Мкг цинка на г белка	
	суспензия	растворимые белки
- Zn	185 ± 1	41 ± 5
+ Zn	187 ± 6	83 ± 4

Большое количество цинка в суспензии хлоропластов указывает на существование в них прочно связанных со строимой цинк-содержащих белков или нерастворимых в воде низкомолекулярных форм цинка.

При диск-электрофорезе в полиакриламидном геле белок и цинк движутся вместе. При этом выделяются две белковые зоны, которым соответствует повышенное содержание цинка. Это указывает на прочность связи цинка с белками.

Прочность связи цинка с белками доказывается также сохранением большого количества цинка в них после диализа и очистки водных экстрактов на сефадексе G-25. Первая порция элюата с сефадекса при диск-электрофорезе показывает типичную картину распределения цинк-содержащих белков на электрофореграмме.

Таким образом, можно считать доказанной прочность связи цинка с растворимыми белками хлоропластов: цинк не отделяется от них при диализе, очистке на сефадексе и при электрофорезе. Повышенное относительное содержания цинка в белках при общем дефиците его в растении позволяет предполагать наличие в растениях какого-то защитного механизма, удерживающего цинк, необходимый для нормальной активности белков.

Влияние недостатка цинка в растениях на белковый состав хлоропластов. — В этих опытах, проводившихся без применения радиоактивного цинка, растворимые белки хлоропластов фракционировали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Путем сопоставления видимых на электрофореграмме белковых зон и белковых зон, обнаруженных в результате анализа денситограмм белков, мы нашли, по крайней мере, 15 белковых фракций среди растворимых белков хлоропластов томата. Их обозначения и относительные электрофоретические подвижности даны в табл. 2. Значения Rf для гелей химической и фотополимеризации даны отдельно.

Таблица 2

Значения Rf белковых фракций

Фракция	Rf		Фракция	Rf	
	XII	ФП		XII	ФП
A	0,08	0,20	I	0,46	—
G ₁	0,13	0,24	D	0,51	0,57
G ₂	0,14	0,27	K	0,53	0,49
II	0,18	0,33	L	0,58	0,63
B ₁	0,27	0,40	M	0,63	0,68
B ₂	0,29	0,44	N	0,67	—
C	0,34	0,47	E	0,71	0,77
			F	1,00	1,00

Как видно из таблицы, на величину Rf влияет способ полимеризации геля, на воспроизводимость Rf способ полимеризации не влияет. В гелях, полученных фотополимеризацией, подвижность высокомолекулярных белков (фракций A—C) значительно больше, что связано, вероятно, с увеличенными размерами пор в этом геле.

Общий вид фракционного состава I, II и три-аскорбатного экстрактов изображен на рис. 1. (рис. 1). В I водном экстракте заметно выделяется фракция A. Вместе со второй по величине фракцией B они составляют до 50% всех белков этого экстракта. Эти фракции легко растворимы и во II

водном экстракте их доля заметно снижается. Фракцию А можно с уверенностью идентифицировать как фракцию I Уилдмена-Боннера (Wildman a. Bonner, 1947). Фракция I является специфическим белком хлоропластов, обладающим карбоксидсмутазной активностью (Андреева и Авдеева, 1970). Малая электрофоретическая подвижность этой фракции объясняется ее большим молекулярным весом. По данным ряда исследователей, молекулярный вес фракции I у различных растений составляет от 570 тыс. до 600 тыс. (Town, 1965; Steeg a. oth., 1968 и др.), и электрофоретическая подвижность у растений из разных семейств так же несколько различается (Сафонов, 1970; Курсанов, Сафонов, Чайнова и Сафонова, 1970 и др.).

По легкой экстрагируемости фракция В похожа на фракцию А и, по всей вероятности, также входит в состав стромы хлоропластов. Идентификация ее пока затруднительна.

Во II водном экстракте заметнее становится фракция D. Несмотря на близкие величины Rf, ее нельзя считать идентичной фракции К, так как последняя не всегда обнаруживается в водных экстрактах. Фракция К преобладает в трис-аскорбатном экстракте; возможно, она относится к слабо связанным ламеллярным белкам. Вполне вероятно, что фракции L, M, N и E трис-аскорбатного экстракта не идентичны одинаково обозначенным фракциям I и II водных экстрактов, несмотря на сходство Rf. Все они более прочно связаны со стромой, чем фракции А и В, так как довольно равномерно переходят в раствор при последовательных экстракциях.

Фракция F, вероятно, является суммой низкомолекулярных белков, не оторвавшихся от фронта раздела буферов. Она всегда имеет коричневую окраску, обусловленную присутствием ферредоксина.

Сравнение фракционного состава белков хлоропластов из растений, содержащих разные количества цинка, показывает, что недостаток цинка в растении не оказывает определенного влияния на качественный состав растворимых белков хлоропластов. В ряде опытов достоверных различий между вариантами не наблюдалось даже в тех случаях, когда растения, не получавшие цинка, проявляли отчетливые признаки его недостаточности. В тех случаях, когда при анализе денситограмм обнаруживались различия по содержанию белка в отдельных фракциях, характер этих различий мог быть совершенно противоположным в разных опытах. В то же время, значительные различия между вариантами от-

мечаются в зимних опытах, когда томаты выращивались под светоустановкой и почти не проявляли видимых признаков недостаточности цинка.

Результаты этих опытов позволяют сделать вывод, что нарушения в составе растворимых белков хлоропластов при недостатке цинка в растении имеют вторичный характер и происходят как следствие нарушений других физиологических процессов, непосредственно зависящих от наличия цинка. Связь эта может быть очень отдаленной, так как при быстром развитии недостаточности цинка нарушаются другие жизненно важные процессы (часто наблюдается сохранение нормального белкового состава даже при сильно выраженных внешних признаках недостаточности цинка). Отдаленность этих процессов может объясняться и неопределенностью влияния цинка на состав растворимых белков хлоропластов.

Цинк-белковые фракции в хлоропластах томата.— Наличие цинка в растворимых белках хлоропластов позволяет предполагать возможность нахождения среди них индивидуальных цинк-содержащих белков. Для проверки этого предположения белки фракционировали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле; цинк в электрофореграммах определяется с помощью радиоактивного индикатора цинк-65.

Распределение белка и цинка при электрофорезе показано на рис. 2.

По оси абсцисс указано расстояние от старта в миллиметрах по направлению к аноду (стартом считается граница между крупнопористым и мелкопористым гелями). Денситограмма окраски изображена сплошной линией, ей соответствует шкала оптических плотностей слева. Распределение цинка отражает гистограмма, каждый столбик которой соответствует секции геля. Справа нанесена шкала радиоактивности секций (импульсы в минуту). Обе величины нанесены с разрывом, так как интенсивность окраски белковой фракции А и радиоактивность фронтальной зоны намного превышают эти показатели в других частях геля.

Следы цинка видны по всей длине гелевого столбика, но, кроме фронтальной зоны, отчетливо выделяются еще две зоны повышенного содержания цинка, одинаково проявляющиеся во всех опытах и вариантах + и — цинк. Одна из них, более заметно выраженная, совпадает с белковой фракцией В и в дальнейшем обозначается так же. Вторая зона цинка, обозначенная буквой Z, находится в районе фракций М — Е,

но не связана конкретно с какой-либо из них. Анализ денситограмм показывает, что фракция Z является митохондриальной, выделяющейся заметно на общем белковом фоне. Максимумы содержания белка и цинка во фракции В во многих случаях хорошо совпадают, но имеющиеся случаи несоответствий (таблица 3) указывают на то, что в состав этой массовой фракции входит, скорее всего небольшой цинк-содержащий компонент.

Таблица 3
Положение белковой фракции В в содержащих цинк фракциях на электрофореграммах растворимых белков хлоропластов

№ опыта и вариант	Rf			
	В		Z	
	белок	цинк	цинк	
1	- Zn	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,66 ± 0,05
	+ Zn	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,67 ± 0,01
2	- Zn	0,29 ± 0,06	0,30 ± 0,06	0,70 ± 0,03
	+ Zn	0,27 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,67 ± 0,01
3	- Zn	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,74 ± 0,01
	+ Zn	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,73 ± 0,02

Цинк, входящий в состав фронтальной зоны, следует рассматривать особо. Эта зона содержит большую часть цинка, нанесенного перед электрофорезом на трубку, но дополнительные опыты показали, что большая часть этого цинка не связана с белками. При анализе вырезанной из гелевого столбика фронтальной зоны концентрации цинка по обе стороны целлофановой мембраны в течение суток выравнивались. При электрофорезе в обычных для наших опытов условиях свободного цинка (раствор $Zn^{65}Cl_2$ или $Zn^{65}SO_4$), около 80% нанесенного на трубку цинка мигрирует к аноду и обнаруживается в районе фронта. Результаты этих опытов позволяют предполагать, что во фронтальной зоне скапливается отрицательно заряженный комплекс цинка, который был прочно связан с белками и отщепился при электрофорезе. Комплексообразователями могут быть глицин буферного раствора, рибофлавин крупнопористого геля или следы других хелатирующих агентов.

В связи с возможностью адсорбции на белках свободного цинка, находящегося внутри хлоропластов, был проведен специальный опыт. Из хлоропластов томатов, росших на обычном питательном растворе, белки экстрагировались буфером,

в который был добавлен радиоактивный цинк. Весь ход процедур по выделению хлоропластов и фракционированию растворимых белков из них был обычным. Результаты опыта показали, что адсорбция цинка на белках все-таки происходит, (после анализа во внутреннем растворе остается некоторое количество цинка), но при электрофорезе этот цинк отщепляется и концентрируется во фронтальной зоне. Прочной адсорбции или быстрого обмена цинка в зонах В и Z не наблюдается. Небольшой цинковый фон вдоль гелевого столбика, вероятно обусловлен адсорбцией цинка на геле и не связан с белками.

Повышение концентрации ЭДТА в гомогенизационном растворе от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-3} M$ не влияет на количество цинка, связанного с белками фракций В и Z.

Сравнение вариантов +Zn и -Zn (рис. 2) показывает, что связанные с цинком фракции имеются как при нормальном снабжении цинком, так и при недостатке его в растении. При недостатке цинка почти в полтора раза уменьшено отношение цинк/белок во фракции В. Для фракций Z и F такое отношение не вычислялось вследствие неопределенности содержания белка в этих фракциях.

Концентрация цинка в зоне фракции В увеличивается при высаливании растворимых белков 30% сульфатом аммония, а в зоне фракции Z — на следующей ступени насыщения (30—50% сульфата аммония).

Таким образом, можно считать, что среди растворимых белков хлоропластов томата имеются, по крайней мере, два содержащих цинк белка. Прочность связи цинка с ними доказывается всеми опытами по фракционированию белков.

По величине Rf, равной в среднем 0,70, нашу фракцию Z можно идентифицировать с карбоангидразой из листьев петрушки (Tobin, 1970). Диск-электрофорез в опытах Тобина проводился в условиях, аналогичных нашим, и увеличение концентрации цинка во фракции происходило при высаливании от 20 до 40% насыщения сульфатом аммония (в наших опытах — от 30 до 50%).

Природа фракции В не более ясна. На основании данных об ее подвижности при диск-электрофорезе и гель-фильтрации на сефадексе G — 100 можно считать, что она имеет молекулярный вес порядка 150 000—200 000. По растворимости в воде и нейтральных буферах белки этой фракции можно отнести к альбуминам. Повышенное содержание цинка во фракции В позволяет предполагать наличие в ее составе хотя бы одного связанного с цинком компонента. Вполне вероятно,

что этим компонентом является цинк-энзим. Близкие нашей фракции В по подвижности при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле энзимы обмена АТФ—АДФ обнаружены Кару и Мудрианакисом (Karu a. Moudrianakis, 1969). Хлоропласты в их опытах также выделялись в водную среду, а фракцию, содержащую эти энзимы, высаливали при насыщении от 0 до 50% сульфата аммония. Не исключено также предположение, что в районе этой фракции находится 6-мер карбоангидраза, имеющий молекулярный вес около 180 000, по данным Тобица (Tobin, 1970). Содержащая цинк карбоангидраза такого же молекулярного веса обнаружена в листьях целого ряда двудольных растений (Patterson, Atkins a. Graham, 1971). Дальнейшее исследование фракции В представляет несомненный интерес.

Цинк в пигментах и липидах хлоропластов. — После экстракции растворимых белков в осадке хлоропластов остается еще до 70% цинка, не переходящего в водные растворы. При обработке этих остатков смесью ацетона с этанолом, а затем петролеином эфиром, в них переходит очень небольшой процент цинка от общего содержания его в суспензии хлоропластов (таблица 4).

Таблица 4
Процентное содержание цинка в пигментно-липидных экстрактах

Экстракт	% цинка от содержания его в суспензии	
	+ Zn	- Zn
Спирт-ацетоновый	0,04	0,12
Петролейно-эфирный	0,01	0,007

Данные таблицы 4 показывают, что при недостатке цинка в растении снижено процентное содержание его в спирт-ацетоновом экстракте. В то же время содержание хлорофилла в обоих вариантах одинаково. Это может указывать на дополнительное извлечение белка, связанного с цинком, и в таком случае согласуется с уменьшением извлекаемости растворимых белков при недостатке цинка, что наблюдалось нами при предыдущих обработках суспензии хлоропластов.

Хроматограммы пигментов имели обычный вид и Rf пигментов соответствовал стандартным значениям, установленным И. А. Поповой (1965) для этого растворителя (петролейный эфир: этанол — 19:1).

На рис. 3 показано относительное распределение цинка на хроматограмме пигментов в процентах от нанесенного в стартовое пятно. Так как абсолютное содержание цинка

в спирт-ацетоновом экстракте очень мало (до 0,7 мкг/мл), точный учет всего цинка, находящегося на хроматограмме, невозможен и сумма не достигает 100% (рис. 3).

На хроматограммах варианта —Zn почти в 1,5 раза повышено содержание цинка в зоне β-каротина (Rf=0,94) и на столько же уменьшено содержание цинка в остальных зонах пигментов.

Около 31% цинка остается в стартовом пятне. Специальный опыт по хроматографии спирт-ацетонового раствора радиоактивного цинка в том же растворителе, который использовался для разделения пигментов, показал, что неорганический цинк по хроматограмме не движется. Большое количество цинка в стартовом пятне может объясняться переходом в спиртовую фазу связанных с цинком белков, а также низкомолекулярных форм цинка, более прочно связанных с ламеллами хлоропластов, чем перешедшие ранее в водную фазу.

Содержание цинка, связанного с пигментами, значительно уменьшается к концу лета, а также при недостатке цинка в растении. На количестве цинка в зоне β-каротина это не отражается.

Комплекс цинка в верхней части хроматограммы точно не идентифицирован. Можно предполагать, что при недостатке цинка в растении, вследствие нарушения нормального хода синтетических процессов, происходит частичная феофитинизация хлорофилла или даже образование феофитината цинка. Это могло бы служить объяснением повышенного содержания цинка в зоне β-каротина и уменьшения его в хлорофилловых зонах (феофитин в петролейном эфире идет вместе с β-каротином): существованием комплекса цинка с феофитином может объясняться и повышенная извлекаемость цинка петролейным эфиром при недостатке цинка в растении. По данным Масловой и Лобас (1965), в феофитинизированных листьях пигмент очень непрочен связан с белком и легко извлекается петролейным эфиром. Введение цинка в молекулу феофитина повышает устойчивость связи пигмента с носителем на 50%.

Однако, абсолютное содержание цинка в виде этого комплекса так мало, что трудно надеяться на физиологическую значимость такого комплекса. Если предположить, что атомы водорода, связанные с азотом пиррольных колец в молекуле феофитина, замещены цинком, то цинк будет составлять 7,3% получаемого соединения. В наших опытах эта величина, полученная соответствующим расчетом, на несколько порядков ниже и составляет от $4 \cdot 10^{-4}$ до $26 \cdot 10^{-4}$ %.

Не исключена также возможность образования комплекса цинка с липидами типа стеролов или терпенов, также идущих при хроматографии в петролейном эфире вместе с фронтом.

Возможно, что у растений, страдающих от недостатка цинка, этот комплекс выполняет какую-нибудь компенсаторную функцию, чем и объясняется повышенное образование его в условиях недостатка цинка.

Содержание цинка, связанного с нерастворимыми остатками хлоропластов, очень велико и доходит до 72 мкг/г сухого веса остатков. В растениях, получавших в питательный раствор цинк, с нерастворимыми остатками хлоропластов связано в 4 раза больше цинка, чем в хлоропластах цинк-дефицитных растений. К концу лета разница между вариантами заметно сглаживается.

Общий обзор полученных результатов позволяет сделать заключение, что основная масса цинка в хлоропластах связана с белками, как растворимыми, так и ламеллярными. Можно предполагать, что основную физиологическую роль в хлоропластах играют именно эти формы цинка. С липидными веществами связано очень мало цинка и их физиологическая значимость менее вероятна по причинам, относящимся к окислительно-восстановительным свойствам цинка. Как известно, цинк не обладает переменной валентностью, необходимой для участия в реакциях, связанных с образованием и обменом липидов. Для цинка более вероятно комплексообразование с сульфгидрильными или аминными группами ферментов. Дальнейшее исследование цинк-содержащих белков будет способствовать более глубокому пониманию физиологической роли цинка.

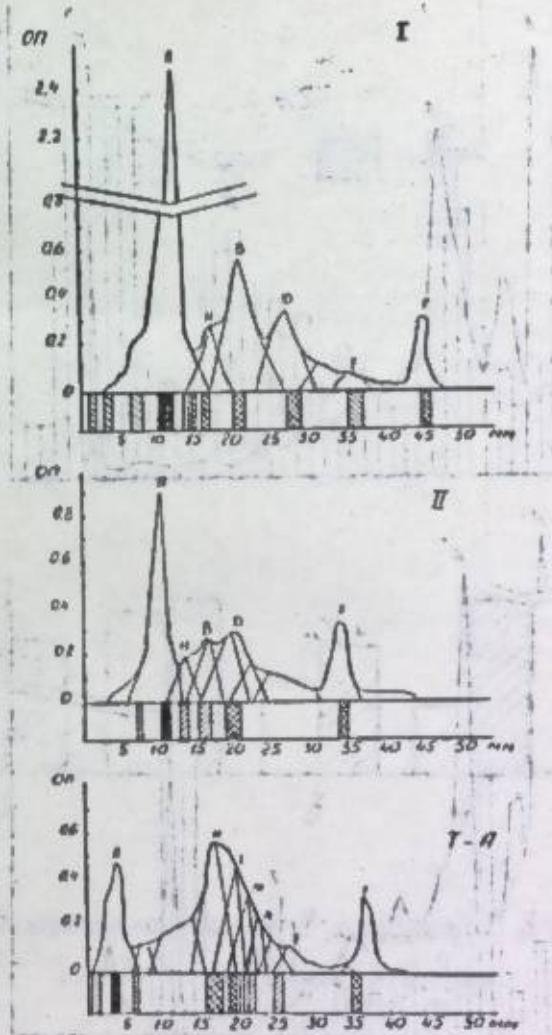


Рис. 1.

Центральная научная
 Библиотека
 Академии наук Украинской ССР

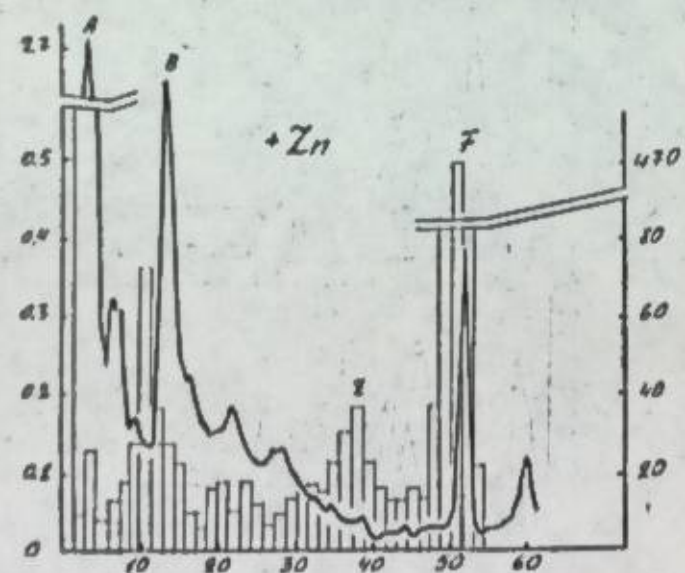
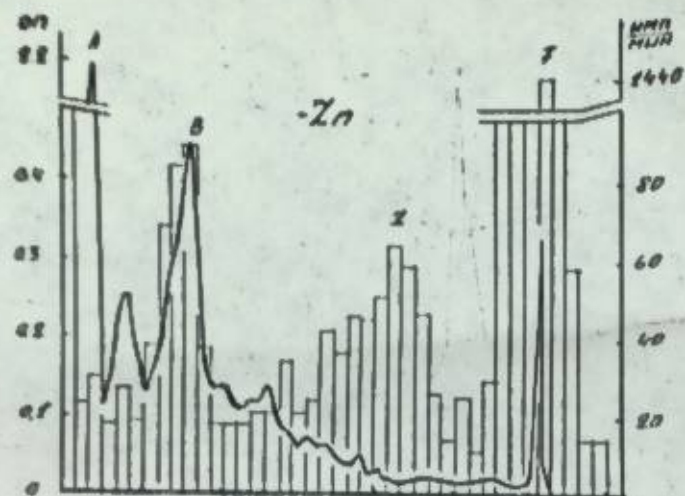
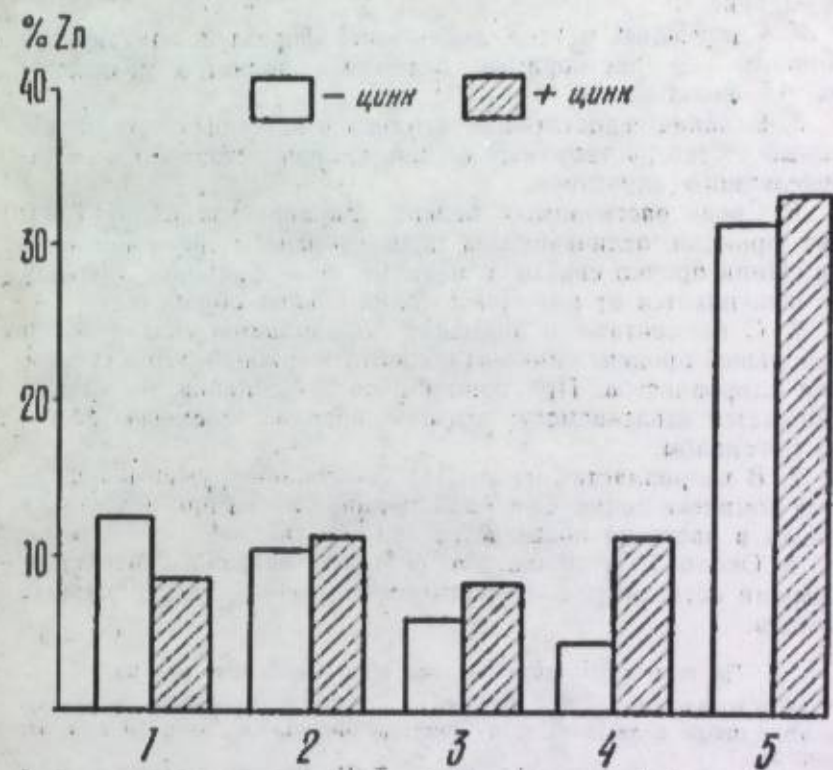


Рис. 2.



1-β-каротин+феофитин 2-хлорофилл а 3-хлорофилл в 4-ксантин 5-стерол

Рис. 3.

Институт биологии
АН УССР
Львов

ВЫВОДЫ

1. Большая часть цинка в хлоропластах томата связана с белками.

2. Содержание цинка в растворимых белках хлоропластов уменьшается при недостатке цинка и связано с условиями освещения.

3. С помощью метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле растворимые белки хлоропластов разделены на 15 фракций.

4. Влияние недостаточности цинка в растениях на фракционный состав растворимых белков хлоропластов не имеет определенного характера.

5. Среди растворимых белков хлоропластов обнаружены две фракции, отличающиеся повышенным содержанием цинка. Цинк прочно связан с белками этих фракций, так как не отщепляется от них при дополнительных обработках.

6. С пигментами и липидами хлоропластов связан очень небольшой процент цинка от общего содержания его в суспензии хлоропластов. При общем недостатке цинка в растении снижается извлекаемость его из хлоропластов смесью ацетона с этанолом.

7. В хлоропластах из листьев томата обнаружен неполярный комплекс цинка. Содержание цинка в нем при недостатке цинка в растении повышается в 1,5 раза.

8. Около 70% цинка хлоропластов связано с нерастворимыми остатками, состоящими, в основном, из ламеллярных белков.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Косицын А. В., Игошина Т. И. Внутрилеточное распределение цинка в листовой ткани томатов. Физиология раст. 1964, т. 11, вып. 2.

2. Косицын А. В., Игошина Т. И. Влияние недостатка цинка на фракционный состав растворимых белков хлоропластов томата. Тезисы докл. II Всесоюзного Биохимического съезда, секц. 13. Ташкент. 1969.

3. Косицын А. В., Игошина Т. И. Связь цинка с белками в хлоропластах и митохондриях томатов. В сб. «Физиологическая роль микроэлементов у растений». Л. Изд. «Наука», 1970.

4. Игошина Т. И., Косицын А. В. О связи цинка с пигментами и липидами хлоропластов. Тезисы докл. VI Всесоюзного Совещания по микроэлементам. Т. 1. Ленинград, 1970.

5. Косицын А. В., Игошина Т. И. Связь цинка с белками в хлоропластах томата. Тезисы докл. VI Всесоюзного Совещания по микроэлементам. Т. 1. Ленинград, 1970.

6. Косицын А. В., Игошина Т. И. Цинк в растворимых белках хлоропластов томата. Физиология раст. 1971, т. 18, вып. 6.