

О ПРОНИКНОВЕНИИ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ

А. Д. ФОКИН, Л. Ф. БОБЫРЬ, Л. А. ЕПИШИНА,
Л. В. КРАВЦОВА, Л. А. ХРИСТЕВА

Вопрос о возможности проникновения гумусовых веществ в растения является до сих пор дискуссионным. В статье А. Д. Фокина, публикуемой в настоящем сборнике, приводятся данные опытов с использованием воднорастворимых гумусовых веществ, меченных по углероду (^{14}C). Они показывают, что эти вещества проникают в растения, причем на степень их проникновения влияют как величина молекулярной массы, так и биологические особенности растений.

Целью наших исследований было выяснение возможности проникновения этих форм гумусовых веществ в клетки растений и в их главные органеллы; ядро, митохондрии, хлоропласты. Для изучения этого были проведены краткосрочные микровегетационные опыты с проростками огурцов сорта Успех и гороха сорта Рамонский. В опытах семена обеих культур в течение 2—3 дней проращивали на водопроводной воде в термостате при температуре 25—27° С. Затем проростки пересаживали на 0,01%-ные растворы воднорастворимых тотально меченных по углероду гумусовых кислот, предварительно разделенные на молекулярных ситах (Молселект) на 3 фракции, которые отличались по молекулярной массе. Методика разделения веществ и расчета их молекулярных масс описана в статьях А. И. Карпукшина и А. Д. Фокина (2, 3, 4). Удельная активность углерода в исходных

препаратах составляла 0,014 $\frac{\text{мкК}}{\text{мг}^{\text{C}}}$; или 30733 $\frac{\text{расп.}}{\text{мин. мг}^{\text{C}}}$,
точн. — 2%.

Для создания асептических условий в среде корневого питания в стаканы вносили антибиотики (4). Затем на 4-й день из гипокотилей этиолированных проростков огурцов получали фракции ядер и митохондрий, а из листьев гороха, которые выращивали при освещении 7—8 тыс. люксов, — фракцию хлоропластов. Выделение ядер проводили путем дифференцированного центрифугирования в градиенте сахарозы по методике Д. Ро и М. Чипчейза (6) в модификации отдела биохимии и цитологии Башкирского филиала АН СССР, а митохондрии по методу М. Г. Зайцевой и З. В. Титовой (1). Хлоропласты выделяли по Р. Весту и Дж. Вискичу (7).

Чтобы избежать механического загрязнения полученных проростков радиоактивной меткой, гипокотили и стебли с листьями срезали на 1 см выше уровня сеток, плавающих в стаканах с водой, куда были внесены гумусовые вещества. (По этой же причине не исследовалось поступление этих веществ в органеллы клеток корня). Навески выделенных ядер и митохондрий, суспендированные в среде выделения, и хлоропластов в 1 мл спирта сжигали на установке Oximat и определяли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном радиометре Mark-2 (табл. 1).

Таблица 1

Содержание ^{14}C в органеллах клеток гипокотилей огурцов и листьях гороха, выращенных на 0,01%-ных растворах гумусовых веществ (опыты 1975 г.)

Фракции гумусовых веществ, меченных по ^{14}C , молекулярная масса в г	Активность распадов в 1 минуту		
	на 500 мг фракции со средой выделения		на 100 мг после удаления среды выделения
	ядра	митохондрии	хлоропласты
500 ± 100	30,4 ± 3,4	63,4 ± 6,3	201,8 ± 20,4
8400 ± 600	61,0 ± 6,1	97,4 ± 9,7	274,0 ± 27,4
12000 ± 2500	36,5 ± 3,7	72,6 ± 7,3	160,0 ± 16,0

Они показывают, что ^{14}C был найден во всех исследованных фракциях органелл, причем на поступление веществ, содержащих метку, оказала влияние величина их молекулярной массы. Из этих данных также следует, что концентрация ^{14}C в разных фракциях была различной. Однако еще нельзя сделать вывода о том, в какие органеллы преимущественно поступают гумусовые вещества, так как эти данные были получены на разных культурах и не в балансовых опытах. Поэтому этот вопрос должен стать предметом дальнейших исследований. Нельзя также утверждать, что гумусовые вещества поступают в растения в виде неизмененных молекул.

Известно, что в среде корневого питания минерализация этих веществ может идти с образованием углекислоты. И если бы это имело место в нашем опыте, то наличие радиоактивного углерода в органеллах клеток можно было бы просто объяснить поступлением меченого углекислого газа в растение. Известно, что процессы минерализации гумусовых веществ осуществляются ферментативно и в естественных условиях связаны с жизнедеятельностью микроорганизмов. В наших опытах это исключено, так как они ставились в асептических условиях.

Тогда может возникнуть предположение, не произошла ли такая минерализация за счет внутриклеточных ферментов? В этом случае отщепление CO_2 должно было бы произойти на плазматических мембранах клеток корня.

Процессы декарбоксилирования в живых клетках осуществляются группой строго специализированных ферментов, которые локализованы в митохондриях, тогда как для плазматических мембран характерны другие ферменты: Na^+ , K^+ , Mg^{++} — зависимая АТФ-аза, аденилциклаза, 5-нуклеиназа, кислая и щелочная фосфатаза, ферменты, деградирующие РНК (6), и другие, которые в декарбоксилировании не участвуют. Более того, Бенедетти и Эммелот (5) проводили специальные исследования и не обнаружили в этих мембранах большинства ферментов, характерных для митохондрий.

Следовательно, предположение, что ^{14}C гумусовых кислот поступает в растение в форме двуокси углерода, отпадает. Значит, есть все основания считать, что меченый углерод, найденный в наших опытах в ядерной и митохондриальной фракциях гипокотилей огурцов и во фракции хлоропластов листьев гороха, поступил туда в органическом состоянии.

Гумусовые вещества, применяемые в наших опытах, были помечены ^{14}C тотально, поэтому на основании этих данных нельзя исключить предположения о том, что в растение поступили не целые молекулы этих веществ, а какие-то их части или фрагменты.

Не решая вопроса, в каком виде поступают в растения гумусовые вещества, мы провели дополнительный опыт только по выяснению

возможности проникновения в растения так называемых ядерных, преимущественно ароматических, фрагментов гумусовых молекул.

Ранее было показано (3), что компостирование меченых гумусовых веществ приводит к быстрой (10—15 суток) микробиологической минерализации 10—17% углерода, входящего в состав их молекул. Остальной углерод образовывал, по-видимому, микробиологически очень устойчивые структуры, едва заметная минерализация которых обнаруживалась лишь при компостировании в течение 4-х и более месяцев. Мы предполагаем, что быстрая минерализация связана с использованием периферических линейных фрагментов гумусовых молекул. В условиях 1 н солянокислого раствора происходит гидролитическое отщепление от гумусовых молекул примерно тех же линейных фрагментов, которые подтверждены микробиологической минерализации. Поэтому обработку гумусовых веществ 1 н HCl мы использовали для условного разделения гумусовых веществ на периферические и ядерные фрагменты (4). Использование для гидролиза раствора более высокой концентрации приводит к более глубокому, в некоторых случаях полному распаду гумусовых веществ.

В данном эксперименте фракция гумусовой кислоты с молекулярной массой 8400 ± 600 была обработана 1 н раствором HCl. При этом часть органического вещества (гуминовые кислоты) выпала в осадок, который затем трижды обрабатывался при центрифугировании 1 н HCl, затем дистиллированной водой до начала пептизации гуминовых кислот. Отмытые гуминовые кислоты растворялись путем добавления минеральных количеств раствора NaOH и вносились в раствор с высаженными 7-дневными проростками гороха. Экспозиция на растворе с мечеными веществами составила 6 суток.

Радиометрия растертых листьев и стеблей показала, что активность выражалась величиной 10472 ± 104 расп/мин. на 100 мг воздушно-сухого вещества при 20944 ± 208 расп/мин. на 100 мг углерода.

Полученный результат соответствует поступлению приблизительно 0,7 мг меченого углерода на 100 мг углерода растительной ткани. Эта величина имеет тот же порядок, что и полученные ранее аналогичные величины (статья А. Д. Фокина в сборнике). Некоторые различия объясняются, по-видимому, неодинаковыми сроками, условиями выращивания, природой растений и т. д. Проведенный эксперимент показывает возможность поступления в органы растений гумусовых веществ, практически освобожденных от периферических, легко отщепляемых фрагментов.

Данные по содержанию ^{14}C в органеллах клеток позволяют утверждать, что гумусовые вещества могут проникнуть не только в отдельные органы растений, но и в клетки, достигая их важнейших органелл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева М. Г., Титова З. В. Изменение активности митохондрий корней пшеницы в связи с концентрацией Mg^{++} в среде инкубации. ДАН СССР, т. 194, № 5, 1970.
2. Карлухин А. И., Фокин А. Д. Хроматографическое фракционирование фульвокислот. Изв. ТСХА, № 5, 1969.
3. Карлухин А. И., Фокин А. Д. Применение гелевой хроматографии для определения молекулярной массы фульвокислот. Изв. ТСХА, № 5, 1970.
4. Фокин А. Д. Включение органических веществ и продуктов их разложения в гумусовые вещества почвы. Изв. ТСХА, № 6, 1974.
5. Benedetti E. L., Emmelot P. The Membranes N. I. Acad. Press, p. 33, 1968.
6. Rho I. H., Chipchase M. I. Cell, Mol, v. 14, p. 183, 1962.
7. West R. H., Wiskich Y. I. Biochem. I., v. 109, p. 527, 1968.

Сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева,
Проблемная лаборатория по гуминовым удобрениям
при Днепропетровском сельскохозяйственном институте.