

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

М. Х. ЧАЙЛАХЯН

**ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 7 I 1954)

Основные физиологические процессы, протекающие в растениях, тесно связаны с деятельностью листьев, которые не только непосредственно воспринимают внешние воздействия, но и являются теми органами, в которых возникают и осуществляются многообразные процессы, связанные с влиянием световой лучистой энергии, газового состава атмосферы, температуры, влажности воздуха и других условий внешней среды. Глубокое и детальное изучение этих процессов и возникающих при этом продуктов обмена возможно лишь при использовании точных количественных методов, значительно усовершенствованных за последнее время. Однако для получения представления об общем характере направленности обмена веществ значительную роль могут сыграть более простые и быстрые способы, например цветные реакции на те или иные вещества.

Широко известна цветная реакция на крахмал или иодная проба Сакса, которая была использована нами (8) при изучении суточной динамики содержания крахмала в листьях растений. При этом ей был придан количественный характер: все обесцвеченные листья погружались на 10 мин. в раствор иода в иодистом кали одной и той же концентрации (1 г иода на 2 г иодистого кали в 2,4 л воды), и по тону окраски по пятибальной системе определялось относительное содержание крахмала.

В поисках простой цветной реакции или пробы на белок, нами при участии Г. В. Крейниной были испытаны основные цветные реакции, ранее примененные Молишем (10) для обнаружения белка в листьях, — биуретовая, ксантопротеиновая и миллонова, а также нингидринная реакция, обычно используемая для обнаружения аминокислот. Испытания проводились на листьях разнообразных растений и показали полную возможность использования всех этих цветных реакций при соответственной подготовке и обработке листьев.

**Подготовка листьев.** Листья растений погружаются в кипящую воду на 1—2 мин., затем переносятся в колбу, заливаются 96% этиловым спиртом и колба с обратным холодильником погружается в горячую водяную баню. Экстрагирование хлорофилла в кипящем спирту производится в течение  $\frac{1}{2}$ —1 часа, после чего обычно наступает полное обесцвечивание листьев. При этом, кроме хлорофилла из листьев экстрагируется большая часть свободных аминокислот и то незначительное количество воднорастворимых альбуминов, которые имеются в листьях. Обесцвеченные листья смачиваются дистиллированной водой и раскладываются в чашки Петри, где и производятся цветные реакции на белок.

**Биуретовая реакция.** Листья погружаются в 5% раствор  $\text{CuSO}_4$  на 1 час., затем промываются дистиллированной водой и заливаются 10% раствором  $\text{NaOH}$ . Листья приобретают фиолетовую окраску, усиливающуюся в течение 1 часа и указывающую на присутствие белков, а также соединений, имеющих пептидные связи, — пептонов и полипептидов.

**Ксантопротеиновая реакция.** Листья заливаются концентрированной азотной кислотой, наполовину разбавленной водой, на 15—30 мин. Листья окрашиваются в желтый цвет вследствие возникновения нитросоединений, обусловленных наличием ароматического ядра белков. Реакцию дают все белки, кроме некоторых протаминов, не содержащих бензольного ядра. При добавлении аммиака, разбавленного 2 объемами воды, желтая окраска переходит в оранжевую, после чего аммиак сливается.

**Миллонова реакция.** Листья заливаются миллоновым реактивом (раствором окиси ртути в избытке крепкой азотной кислоты) на  $\frac{1}{2}$ —1 час., после чего реактив сливается. Листья окрашиваются в мясокрасный цвет, указывающий на присутствие белков, содержащих бензольное ядро с гидроксилом, характерное для тирозина.

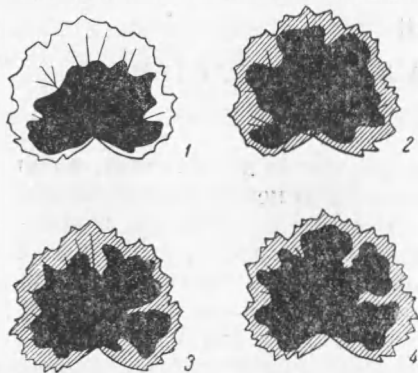


Рис. 1. Распределение крахмала и белка в листьях пестролистной пеларгонии по цветным реакциям. 1—иодная реакция на крахмал; 2—ксантопротеиновая, 3—миллонова и 4—нингидридная реакции на белок

**Нингидридная реакция.** Листья заливаются 0,25% раствором нингидрина на 10 мин., просушиваются фильтровальной бумагой, закладываются между двумя стеклянными пластинками и помещаются в термостат при 80°. Через 20 мин. листья окрашиваются в фиолетово-синий цвет благодаря соединению нингидрина с аминокислотами белков, не входящими в пептидные связи, и образованию продукта конденсации нингидрина. Реакцию дают и те немногие свободные аминокислоты, которые нерастворимы в воде и этиловом спирте и остаются в листьях.

Описанные цветные реакции на белок получались на листьях всех испытанных видов: капусты (*Brassica oleracea*), свеклы (*Beta vulgaris*), примулы (*Primula verna*), хризантемы (*Chrysanthemum indicum*), олеандра (*Nerium oleander*), грейпфрута (*Citrus grandis*) и других, но различной интенсивности и оттенков, характерных для отдельных видов.

При точном соблюдении условий подготовки листьев и обработки их соответствующими реактивами оказалось возможным по интенсивности окраски определять относительное содержание белка в листьях по пятибалльной системе и, следовательно, использовать цветные реакции на белок при решении некоторых вопросов физиологии растений. Цветные реакции на белок были нами применены в опытах с пестролистными растениями, с влиянием света и темноты, а также с влиянием света разного спектрального состава. Параллельно проводилась и цветная реакция на крахмал.

Распределение белка в листьях пестролистных форм. Нами были произведены пробы или цветные реакции на крахмал и белок в листьях растений пестролистной пеларгонии (*Pelargonium zonale*) и пестролистной гортензии (*Hydrangea hortensis*) в октябре и ноябре. Четкую картину дали иодная реакция на крахмал и все четыре реакции на белок. Результаты этих реакций, проведенных с листьями пестролистной пеларгонии, представлены на рис. 1.

Выяснилось, что распределение крахмала и у пеларгонии, и у гортензии строго ограничивается зеленой частью листа (3), колеблясь между 3 и 4 баллами по пятибалльной системе, тогда как в белых частях крахмала не обнаруживается вовсе. Белок при всех реакциях как у пеларгонии, так и у гортензии обнаруживается во всей пластинке листа, однако в зе-

ленной части его значительно больше (3—4 балла), чем в белых краях (1—2 балла), а линия, разграничивающая относительно высокое содержание белка от более низкого, точно совпадает с линией разграничения зеленой части пластинки от ее белых краев.

Это свидетельствует о том, что не только образование крахмала, но и образование белка тесно связано с фотосинтетической деятельностью хлорофиллоносных тканей листа.

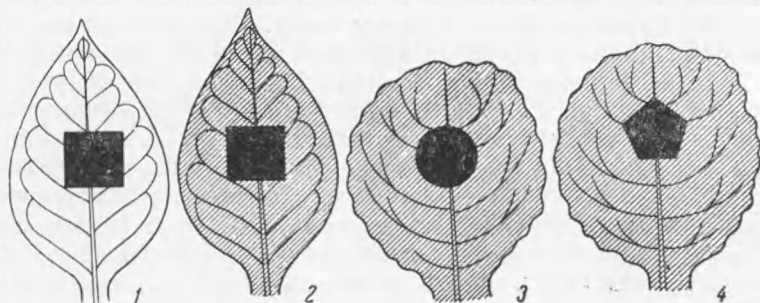


Рис. 2. Крахмальные и белковые фигуры, полученные в результате цветных реакций в листьях табака и капусты. 1—иодная реакция на крахмал; 2—нингидриновая реакция на белок в листьях табака; 3, 4—миллонова реакция на белок в листьях капусты

**Влияние света и темноты на образование белка.** В наших опытах были взяты молодые растения табака Трапезунд (*Nicotiana tabacum*) и капусты. Растения табака предварительно несколько дней выдерживались в непрерывной темноте, а затем их листья были покрыты футлярами из черной светонепроницаемой бумаги с вырезанными в середине квадратами, и растения были помещены на окно лаборатории на сравнительно слабый октябрьский дневной свет. Через 6 суток листья были срезаны и в них были произведены цветные реакции — иодная реакция на крахмал и нингидриновая реакция на белок. По пятибалльной системе содержание крахмала в освещенном квадрате равнялось 3, в неосвещенной части 0; содержание белка в освещенном квадрате равнялось 3, в неосвещенной части 1,5.

На листья капусты без предварительного выдерживания растений в непрерывной темноте были надеты бумажные светонепроницаемые футляры с вырезанными на них кругом и пятиугольником, и растения были поставлены под яркий свет люминесцентных ламп. Через трое суток листья были срезаны и в них была произведена миллонова реакция на белок. Содержание белка в освещенных круге и пятиугольнике равнялось 5, в неосвещенной части 4. На рис. 2 приводятся результаты цветных реакций, произведенных в опытах с табаком и капустой.

Из приведенных данных видно, что не только синтез крахмала, но и образование белка непосредственно связано с усвоением световой энергии и фотосинтезом.

Влияние спектрального состава света на образование белка. Образование белков в процессе фотосинтеза наряду с углеводами было впервые показано В. В. Сапожниковым (5); в дальней-

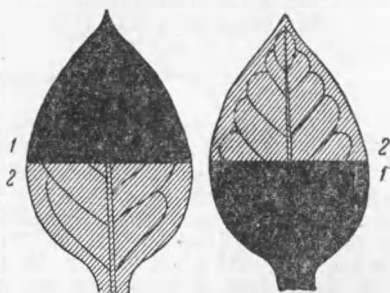


Рис. 3. Протеинограмма в листьях табака, полученная после их экспозиции на свету разного качества и обнаружения белка нингидриновой реакцией. 1—синий свет, 2—красный свет

шем эта идея получила развитие в работах В. Н. Любименко (2), В. О. Таусона (6) и А. А. Ничипоровича (4). В. И. Палладин (11) доказал, что синтезу белков в листьях растений способствует коротковолновая сине-фиолетовая часть спектра, и недавно это положение получило новые подтверждения (9, 1).

В широко известном опыте К. А. Тимирязева (7) была показана связь между спектральным составом и образованием крахмала на листе гортензии и была получена амилограмма. В нашем опыте были взяты растения табака Мамонт, выращенные на дневном свете. Листья были выставлены одной половиной на красный свет, а другой — на синий свет люминесцентных ламп, для чего в картонной перегородке, разделяющей участки со светом разного качества, были сделаны щели и через них наполовину пропущены листья. На свету листья находились 5 суток, а затем они были срезаны и в них проведена нингидриновая реакция на белок. В половинах листа, которые находились на синем свете, содержание белка определялось 3—4 баллами; в половинах которые находились на красном свете, 1 баллом. Результаты опыта, показывающего более интенсивное образование белка на синем свете, представлены на рис. 3.

Подобно тому, как изображение распределения крахмала в листе в зависимости от спектрального состава света называется амилограммой, полученное изображение распределения белка в листе в зависимости от качественного состава света может быть названо протеинограммой.

Приведенные здесь данные свидетельствуют о том, что рассматриваемые цветные реакции на белок могут быть применены для быстрого и простого обнаружения белка и его распределения в листьях растений, а в сочетании с цветной реакцией на крахмал могут быть широко использованы при решении различных вопросов физиологии растений.

Институт физиологии растений  
им. К. А. Тимирязева  
Академии наук СССР

Поступило  
28 XII 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. П. Воскресенская, Тр. Инст. физиол. раст. им. К. А. Тимирязева, 8, в. 1 (1953). <sup>2</sup> В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. <sup>3</sup> Г. Молиш, Физиология растений как теория садоводства, 1933. <sup>4</sup> А. А. Ничипорович, Природа, № 4 (1952). <sup>5</sup> В. В. Сапожников, Белки и углеводы зеленых листьев как продукты ассимиляции, 1894. <sup>6</sup> В. О. Таусон, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5 (1947). <sup>7</sup> К. А. Тимирязев, Избр. соч., I, 1943. <sup>8</sup> М. Х. Чайлахян, Изв. АН Арм.ССР, 16, № 4 (1953). <sup>9</sup> R. H. Dastur, U. K. Kanitkar, M. S. Rao, Ann. of Botany, 2, No. 8 (1938). <sup>10</sup> H. Molisch, Zs. f. Bot., 8 (1916). <sup>11</sup> W. I. Palladine, Rev. gén. de Bot., 11, No. 13 (1899).