

УДК 631.811.1

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ НИТРАТА И АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ У ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ВНЕСЕНИИ ХЛОРИСТОГО АММОНИЯ В ПИТАТЕЛЬНЫЙ РАСТВОР

Б. П. РЕДДИ, М. Н. КОНДРАТЬЕВ, Е. Е. КРАСТИНА  
(Кафедра физиологии растений)

Азот играет ведущую роль в жизнедеятельности растений, поэтому представляет большой интерес изучение механизмов регуляции поглощения и первичной ассимиляции растениями минеральных форм азота. В корневой среде часто присутствуют две формы минерального азота — нитратная и аммонийная. В связи с этим актуальным является исследование взаимодействия этих двух форм при регуляции азотного питания целостного растения.

Присутствие в питательной среде ионов аммония сказывается как на поглощении растениями ионов нитрата, так и на активности нитратредуктазы (НР). Отмечено, что ионы аммония подавляют поглощение нитрата пшеницей [6, 17, 21], кукурузой [7], рисом [31], ячменем [25], райграсом [19], яблоней [13]. Однако в некоторых исследованиях не было установлено существенного влияния ионов аммония на поглощение кукурузой нитратного азота [11, 29, 38].

Относительно воздействия этих ионов на активность НР имеются противоречивые данные. Ингибирование ее активности в присутствии аммонийного азота наблюдалось у проростков пшеницы [5, 6], в корнях виноградной лозы [3], яблони [12], хлопчатника [27], ячменя [34] и голубики [36]. Слабый эффект отмечен в опытах с проростками кукурузы [20, 30]. Стимуляция индукции НР под влиянием ионов аммония была отмечена в семядолях редиса [15], корнях маша [14], в изолированных листьях или проростках пшеницы [10, 37] и в верхушках побегов гороха [32, 33]. В присутствии ионов аммония наблюдалась стимуляция индукции в корнях проростков кукурузы, хотя способность их восстанавливать нитрат ( $^{15}\text{N}$ ) *in vivo* мало изменялась [22]. Противоречивость данных, полученных разными методами и у разных объектов, говорит о необходимости дальнейшего изучения влияния ионов аммония на активность НР у высших растений.

В ряде работ указывается на взаимосвязь между интенсивностью поглощения растениями нитратного азота и активностью НР в их органах. Однако в последнее время высказывается мнение об относительной независимости процессов поглощения и первичной ассимиляции нитратного азота [16]. Еще менее ясен вопрос о такой взаимосвязи для случая, когда в среде присутствуют ионы аммония, влияющие и на поглощение, и на первичную ассимиляцию нитратного азота, причем не всегда однозначно. В связи с этим мы поставили перед собой задачу исследовать влияние дополнительного внесения аммонийного азота на поглощение интактными растениями ионов нитрата и активность НР в их корнях. В своих опытах мы использовали короткую экспозицию (4 ч), чтобы определить непосредственную реакцию растений на изучаемый фактор, пока у них не проявились вторичные изменения (интенсивности ростовых процессов, содержания органиче-

ских кислот и т. д.). Мы предположили, что для исследуемых явлений может иметь значение соотношение ионов нитрата и аммония в питательной среде, поэтому варьировали это соотношение.

## Методика

Объектом исследований были 30-дневные растения подсолнечника сорта Передовик. Семена проращивали в биологическом термостате при температуре 25° и высаживали на сетках кристаллизаторов, наполненных водопроводной водой. Через 4 дня проростки пересаживали в литровые сосуды с питательной смесью Кнопа (нитратная форма азота). Концентрация солей в этой смеси составляла сначала (12 сут) 0,2 нормы, а затем 0,5 нормы. Исключением был только один вариант опыта 1, в котором часть растений выращивали постоянно при 0,2 нормы. Питательный раствор меняли каждые 6 дней, pH его доводили до 5,6 ежедневно. В смесь Кнопа дополнительно вносили следующие микроэлементы: Fe, Cu, Zn, B, Mn и Mo (последний в концентрации 0,05 ммоль).

Растения выращивали в контролируемых условиях температуры и освещения. Температура воздуха в теплице  $20 \pm 1^\circ$  круглосуточно. Источником света служили люминесцентные лампы ЛБЦ-30. Освещенность около растений 10 клк. Длина светового периода 16 ч (с 6 до 22 ч).

У растений 30-дневного возраста определяли влияние ионов аммония, внесенных в питательный раствор в форме  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , на поглощение  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и на активность НР в корнях. В вариантах с 0,2 нормы смеси Кнопа (1,7 ммоль  $\text{NO}_3^-$ ) вносили 1,7; 3,4 и 5,1 ммоль  $\text{NH}_4^+$ , в вариантах с 0,5 нормы (4,25 ммоль  $\text{NO}_3^-$ ) — 4,25; 8,5 и 12,75 ммоль  $\text{NH}_4^+$ . Следовательно, в обеих группах вариантов соотношение ионов  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  в опытных растворах составляло соответственно 1:1, 2:1 и 3:1. Контрольным был вариант без дополнительного внесения в раствор ионов аммония. Биологическая повторность 5-кратная. Экспозиция 4 ч (с 8 до 12 ч дня, т. е. в световой период суточного цикла). До и после

экспозиции в растворах определяли объем, pH и концентрацию перечисленных выше ионов. Исходный объем опытных растворов составлял 300 мл (на 1 растение), исходное значение pH 5,6.

В опыте 1 после экспозиции растения переносили на водопроводную воду и срезали у них надземную часть для сбора пасоки, выделяемой корневой системой. Пасоку собирали в течение 4 ч (с 13 до 17 ч дня).

В опытах 2 и 3 в конце экспозиции определяли в корнях активность НР *in vivo* методом Яворского [18]. Навеску 1 г сырых корней, взятую из средней пробы, помещали в темную склянку и приливали 10 мл инкубационной среды следующего состава: 0,1-молярный фосфатный буфер с pH 7,25 в количестве 2 мл; 0,02-молярная  $\text{KNO}_3$  — 5 мл; 5% пропанол — 1—0,5 мл; 2 капли хлорамфеникола в концентрации 0,5 мг/мл; вода — 2,5 мл. Склянку герметично закрывали и помещали в темноту на 1 ч при температуре 25°. Нитриты окрашивали 1% сульфаниламидом в 3-молярной HCl и 0,02% N-1-нафтилэтилендиаиндигидрохлоридом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Спекол» при длине волны 540 нм. Активность фермента выражали в ммольях  $\text{NO}_2^-$  на 1 г сырых корней за 1 ч.

Поглощение воды растениями определяли по изменению объема питательного раствора, а элементов минерального питания — по изменению их содержания в последнем за время экспозиции. Результаты выражали в миллилитрах воды и в милли- и микромолях элементов на 1 г сухой массы корней за 4 ч. Нитратный азот в питательных растворах и пасоке определяли колориметрическим методом [8], аммонийный — фотоколориметрическим методом с использованием реакции индофенольной зелени [2], калий — на пламенном фотометре, кальций и магний — на атомно-абсорбционном анализаторе. Аналитическая повторность 2-кратная.

## Результаты

В опыте 1 сухая масса корней одного растения через 30 сут составляла 0,70 г при 0,2 нормы смеси и 1,05 г — при 0,5 нормы. У первых влияние ионов аммония на изучаемые процессы было более слабым, хотя для обеих групп получены сходные данные.

Из рис. 1, а видно, что наличие в среде ионов  $\text{NH}_4^+$  в одинаковом с ионами  $\text{NO}_3^-$  количестве (соотношение 1:1) стимулировало поглощение воды растениями подсолнечника, но при их соотношении 2:1 и 3:1 указанный стимулирующий эффект снимался.

Внесение в среду ионов аммония уменьшало поглощение растениями нитратного азота, и тем сильнее, чем выше была концентрация первых (рис. 1, б). Особенно сильно подавлялся указанный процесс при 0,5 нормы смеси Кнопа.

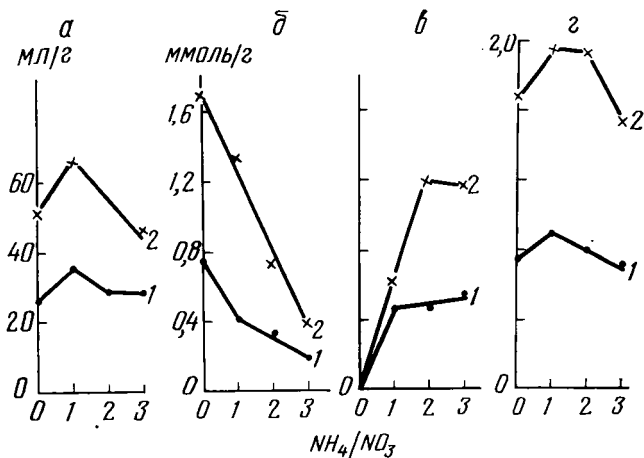


Рис. 1. Поглощение воды (а), ионов нитрата (б), аммония (в) и суммарно двух форм азота (г) подсолнечником при разном соотношении  $NH_4^+/NO_3^-$  в питательном растворе (в расчете на 1 г корней).  
1 и 2 — соответственно 0,2 и 0,5 нормы смеси Кнопа.

Поглощение ионов аммония растениями в группе с низкой концентрацией питательной смеси мало зависело от соотношения двух форм азота, однако в случае 0,5 нормы смеси Кнопа оно было значительно выше при соотношении  $NH_4^+/NO_3^-$  2:1, чем при соотношении 1:1 (рис. 1, в). Суммарное поглощение двух форм азота достигало максимума при равных их количествах в питательном растворе (рис. 1, г).

Анализ пасоки подсолнечника показал, что и у контрольных, и у опытных растений ионы аммония присутствовали в пасоке в ничтожном количестве, т. е. внесение хлористого аммония в питательный раствор на 4 ч не повлияло на содержание аммонийного азота в пасоке. Однако у последних отмечено резкое уменьшение в пасоке концентрации нитрата, причем в данном случае соотношение двух форм азота в среде не имело существенного значения (рис. 2). Следовательно, в условиях нашего опыта (при короткой экспозиции) соотношение  $NH_4^+/NO_3^-$  в питательной среде контролировало интенсивность поглощения нитратного азота растениями, но не выделение его с пасокой.

Так как результаты, полученные при двух концентрациях питательной смеси (0,2 и 0,5 нормы), оказались сходными, но рост подсолнечника и отчетливость данных были лучше при более высокой концентрации солей, то в следующих опытах мы использовали только этот вариант минерального питания растений (0,5 нормы смеси Кнопа).

В опыте 2 установлено в основном такое же влияние ионов аммония на поглощение подсолнечником воды, нитратного и аммонийного азота, как и в опыте 1, но были и небольшие отличия в эффекте соотношения двух форм азота в среде. Максимальное поглощение воды отмечено при их соотношении 2:1, а не 1:1 (рис. 3, а). В опыте 2 наблюдалось также меньшее поглощение растениями ионов аммония при соотношении 3:1, чем при 2:1, тогда как в опыте 1 не было различий между растениями этих двух вариантов по данному по-

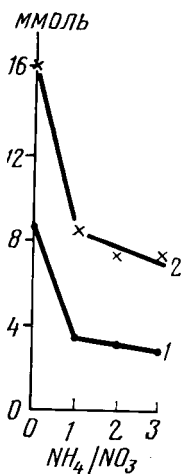
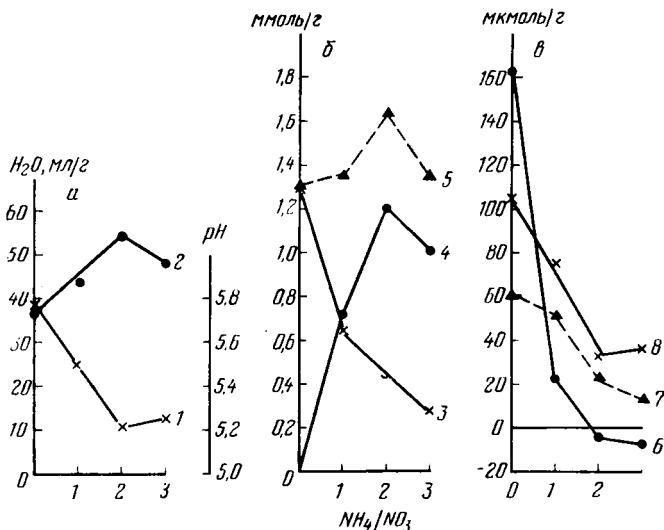


Рис. 2. Концентрация нитратного азота в пасоке подсолнечника.

1, 2 — соответственно 0,2 и 0,5 нормы смеси Кнопа.

Рис. 3. Изменение рН питательного раствора, поглощение воды (а), азота (б) и катионов (в) подсолнечником при разном соотношении двух форм азота в растворе (в расчете на 1 г корней).

1—рН; 2—вода; 3—нитратный азот; 4—аммонийный азот; 5—сумма двух форм азота; 6—K; 7—Mg; 8—Ca.



казателю (рис. 3, б). Суммарное поглощение двух форм азота было максимальным при соотношении в среде  $NH_4^+/NO_3^-$  2 : 1. Следовательно, в обоих опытах обнаружилось соответствие между интенсивностью поглощения растениями воды и суммарного количества азота. Максимумы поглощения воды и азота отмечались у растений одного варианта: в опыте 1 и 2 соответственно при соотношении в среде  $NH_4^+/NO_3^-$  1 : 1 и 2 : 1.

Влияние ионов аммония на поглощение растениями нитратного азота было одинаковым в обоих опытах. Этот процесс подавлялся тем сильнее, чем выше была концентрация аммония в питательном растворе (рис. 3, б).

Кроме того, в опыте 2 определили влияние ионов аммония на рН питательного раствора, поглощение растениями катионов K, Ca и Mg, а также на активность НР в корнях подсолнечника.

Изменения значений рН были противоположными в растворах у контрольных и опытных растений: у первых они повышались по сравнению с исходным (5,6), а у вторых — снижались (рис. 3, а). Подкисление питательного раствора в разных опытных вариантах было примерно одинаковым.

Внесение в питательную смесь Кнопа ионов аммония резко уменьшало поглощение растениями катионов K, Ca и Mg, несмотря на короткую экспозицию воздействия (4 ч). Особенно сильно тормозилось поглощение ионов K, которые даже выделялись из корней в среду при высоких концентрациях аммонийного азота (рис. 3, в). Уменьшение поглощения Mg было пропорциональным концентрации аммонийного азота. Снижение поглощения Ca опытными растениями по сравнению с контролем усиливалось при увеличении соотношения  $NH_4^+/NO_3^-$  от 1 : 1 к 2 : 1, но далее не изменялось при соотношении 3 : 1. Так как ионы аммония затормаживали поглощение K сильнее, чем двухвалентных катионов, соотношение между поглощаемыми катиона-

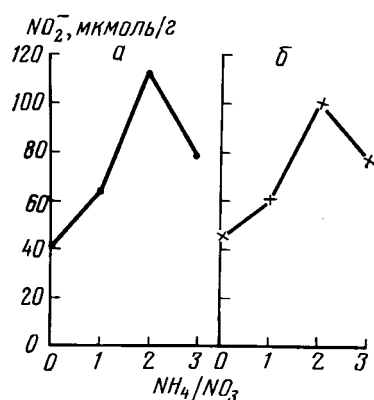


Рис. 4. Влияние ионов аммония на активность нитратредуктазы в корнях подсолнечника (в расчете на 1 г сырой массы корней). а — опыт 2; б — опыт 3.

ми у опытных растений было иным, чем у контрольных. При отсутствии в среде ионов аммония растения поглощали больше К, чем Са или Mg, тогда как в присутствии первых наблюдалась обратная картина — растения поглощали больше Са и Mg, чем К).

Большой интерес представляют данные, полученные при определении активности НР в корнях. Из рис. 4, а видно, что добавление в среду ионов аммония не снижало, а увеличивало активность НР в корнях через 4 ч. Стимуляция активности фермента имела криволинейную зависимость от соотношения двух форм азота в среде. Максимальной была активность НР в корнях при их соотношении 2:1, т. е. в варианте, где растения поглощали наибольшее количество двух форм азота (в сумме) и воды.

В опыте 3 были полностью воспроизведены результаты, полученные в предыдущем опыте (рис. 4, б). Добавление в среду ионов  $\text{NH}_4^+$  увеличивало активность НР, причем максимальная стимуляция была при соотношении в среде  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  2:1.

### Обсуждение

Обычно растения поглощают больше воды при питании нитратным азотом, чем аммонийным [1, 4, 24, 26, 28, 35]. В наших опытах установлено, что поглощение воды растениями в первые 4 ч изменялось в зависимости от соотношения этих двух форм азота в среде. Чаше всего ионы аммония стимулировали этот процесс. Максимальное поглощение воды отмечалось у растений при таком соотношении двух форм азота, когда обеспечивалось наибольшее суммарное поглощение азота: в опыте 1 — при соотношении  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  1:1, в опыте 2 — при соотношении 2:1. С повышением концентрации ионов аммония до 3:1 оно было слабее, чем в указанных выше вариантах.

В наших опытах подтвердилось отрицательное влияние ионов аммония на поглощение растениями нитратного азота. В литературе имеются разные теоретические объяснения этого явления. Их можно объединить в две группы. В первой группе воздействие  $\text{NH}_4^+$  на поглощение растениями  $\text{NO}_3^-$  связывается с нарушением структуры системы поглощения ионов корнями, во второй — с ингибированием фермента НР [16]. Результаты наших опытов свидетельствуют против второго объяснения. При соотношении в среде  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  2:1 поглощение нитратного азота было значительно меньше, чем в контроле (в среде только нитратный азот), а активность НР в их корнях более чем в 2 раза выше. Эти данные подтверждают также положение об определенной независимости процессов поглощения и первичной ассимиляции нитратного азота. В литературе имеются также данные и о том, что для индукции НР в корнях растений не требуется интенсивного поглощения ионов нитрата [23].

Снижение интенсивности поглощения нитрата в присутствии ионов аммония в условиях наших опытов вряд ли можно объяснить нарушением структуры системы поглощения ионов корнями. Используемые в опытах концентрации ионов аммония не выходили за пределы физиологической нормы и не могли привести к избыточному накоплению этих ионов в корнях. По-видимому, снижение поглощения ионов нитрата опытными растениями было вызвано лишь тем, что их потребность в азоте удовлетворялась за счет двух его форм. Об этом свидетельствует и тот факт, что суммарное поглощение двух форм азота опытными растениями было таким же, как в контроле, или даже несколько увеличенным.

Положительное влияние ионов аммония на индукцию НР объясняют стимуляцией синтеза специфических регуляторных белков [10,

32, 33]. Но для объяснения установленного нами увеличения активности НР под влиянием внесения ионов аммония в среду с нитратным азотом, когда растения не нуждаются в индукции этого фермента, необходимы дальнейшие исследования.

Известно, что растения поглощают больше катионов К, Са и Mg при питании нитратным азотом, чем аммонийным. Сводка основной литературы по этому вопросу имеется в работе [1]. В наших опытах было показано, что поглощение данных катионов уменьшается уже в первые 4 ч после внесения ионов аммония в питательный раствор, содержащий нитратный азот (в 2—8 раз для К+Са+Mg). При соотношении  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  2 : 1 и 3 : 1 наблюдалось даже выделение К из корней опытных растений.

Влияние ионов аммония на поглощение катионов К, Са и Mg из питательного раствора, содержащего обе формы азота, объясняют следующими причинами: конкуренцией между катионами К, Са, Mg и катионами аммония непосредственно или катионами  $\text{H}^+$ , выделяемыми при поглощении растениями ионов аммония; подавлением поглощения ионов нитрата [9, 17]. В условиях наших опытов все перечисленные причины, по-видимому, могли иметь место. При внесении ионов аммония в питательный раствор растения интенсивно поглощали эти катионы; значение рН в опытных растворах снижалось, что говорит об увеличении в них концентрации  $\text{H}^+$ ; поглощение ионов нитрата уменьшалось в 2—4,6 раза по сравнению с контролем (в зависимости от отношения двух форм азота).

Таким образом, в наших опытах было показано быстрое изменение поглощающей функции корней подсолнечника под влиянием ионов аммония, внесенных в питательную смесь Кнопа.

## Выводы

1. Внесение ионов аммония в питательный раствор оказывает противоположное влияние на поглощение подсолнечником ионов нитрата и на активность нитратредуктазы в корнях: первое подавляется, а вторая — усиливается.

2. Уменьшение поглощения ионов нитрата растениями пропорционально значению соотношения  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  в питательном растворе (в пределах от 1 : 1 до 3 : 1), но увеличение активности нитратредуктазы в корнях имеет максимум при соотношении 2 : 1.

3. Полученные результаты говорят об отсутствии координации между поглощением и первичной ассимиляцией ионов нитрата растениями при наличии двух форм минерального азота в питательной среде.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крастина Е. Е., Лосева А. С. Влияние формы азотного питания на поглощение воды растениями, концентрацию и соотношение катионов в их органах. — Изв. ТСХА, 1975, вып. 5, с. 13—21. — 2. Методические указания по анализу почв, кормов, растений и удобрений. М., ЦИНАО, 1976, с. 9—13. — 3. Нуцубидзе Н. Н., Морчиладзе З. Н., Марченко Т. Ф. Изучение некоторых свойств нитратредуктазы виноградной лозы. — В сб.: Ферменты окисл.-восстановит., ферменты раст. и амилотитич. ферменты плесн. грибов. Тбилиси, 1975, с. 71—79. — 4. Петин Н. С., Павлов А. Н. О взаимосвязи между поглощением минеральных веществ и воды кукурузой. — В сб.: Корневое питание в обмене веществ и продуктивности растений. М.: Изд-во АН СССР, 1961, с. 116—117. — 5. Blondel A.-M. Blanc D. — C. R. Acad. Sci. Paris, 1973, vol. 277, Serie D, p. 1325—1327. — 6. Breteler H., Smith A. L. — Neth. J. Agr. Sci., 1974, vol. 22, p. 73—81. — 7. Butz R. G., Jackson W. A., Volk R. J. — Agron. Abstracts, 1975, p. 69. — 8. Cataldo D. A., Haroon M., Schrader L. E., Youngs V. L. — Commun. Soil Sci. Plant Anal., 1975, vol. 6, p. 71—81. — 9. Cox W. J., Reisenauer H. M. — Plant a. Soil, 1973, vol. 38, p. 363—380. — 10. Datta N., Rao L. V. M., Guha - Mukherjee S., Sopory S. K. —

- Plant Sci. Lett., 1981, vol. 20, p. 305—313. — 11. Edwards J. H., Barber S. A. — Agron. J., 1976, vol. 68, p. 17. — 12. Frith G. J. T. — Plant. Cell Physiol., 1972, vol. 13, p. 1085—1090. — 13. Frith G. J. T., Nichols D. G. — Physiol. plant., 1975, vol. 33, p. 247—250. — 14. Higgins T. J. V., Goodwin P. B., Carr D. J. — Aust. J. Plant Physiol., 1974, vol. 1, p. 1—8. — 15. Ingle J., Joy K. W., Hageman R. H. — Biochem. J., 1966, vol. 100, p. 577—588. — 16. Jackson W. A. — In: Nitrogen in the environment, Acad. Press, N. Y., 1978, vol. 2, p. 45—88. — 17. Jackson W. A., Kwik K. D., Volk R. J. — Physiol. plant., 1976, vol. 36, p. 174—181. — 18. Jaworski E. G. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, vol. 43, p. 1274—1279. — 19. Lycklama J. — Acta Bot. Neer., 1963, vol. 12, p. 361—423. — 20. Mehta P., Jain A., Srivastava H. S. — Physiol. Plant., 1980, vol. 49, p. 417—420. — 21. Minotti P. L., Williams D. C., Jackson W. A. — Crop Sci., 1969, vol. 9, p. 9—14. — 22. Oaks A., Stulen I., Boessel I. — Can. J. Bot., 1979, vol. 57, p. 1824—1929. — 23. Oaks A., Wallace W., Stevens D. — Plant Physiol., 1972, vol. 50, p. 649—654. — 24. Pill W. G., Lambeth V. N. — J. Am. Soc. Hort. Sci., 1977, vol. 102, p. 78—81. — 25. Prasad Rao K., Rains D. W. — Plant physiol., 1976, vol. 57, p. 55—58. — 26. Oueddaux B., Ozbun J. L. — Plant physiol., 1973, vol. 52, p. 677—679. — 27. Radin J. W. — Plant physiol., 1975, vol. 55, p. 178—182. — 28. Ragab S. M. — J. Agr. Sci., 1980, vol. 94, p. 145—150. — 29. Schrader L. E., Domska D., Jung P. E. Jr., Peterson L. A. — Agron. J., 1972, vol. 64, p. 690—695. — 30. Schrader L. E., Hageman R. H. — Plant physiol., 1967, vol. 42, p. 1750—1756. — 31. Shen T. C. — Plant physiol., 1969, vol. 44, p. 1650—1655. — 32. Sihag R. K., Guha-Mukherjee S., Sopory S. K. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, vol. 85, p. 1017—1024. — 33. Sihag R. K., Guha-Mukherjee S., Sopory S. K. — Physiol. plant., 1979, vol. 45, p. 281—287. — 34. Smith F. W., Thompson J. W. — Plant Physiol., 1971, vol. 48, p. 219—223. — 35. Stuart D. M., Haddock J. L. — Plant Physiol., 1968, vol. 43, p. 345—350. — 36. Townsend L. R. — Can. J. Plant. Sci., 1970, vol. 50, p. 603—605. — 37. Vijayaraghavan A. J., Sopory S. K., Guha-Mukherjee S. — Z. Pflanzenphysiol., 1979, Bd 93, S. 395—402. — 38. Warncke D. D., Barber S. A. — Agron. J., 1973, vol. 65, p. 950—952.

*Статья поступила 5 октября 1981 г.*

#### SUMMARY

In 30-day old nitrate nitrogen grown plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) estimated nitrate uptake and root Nitrate Reductase Activity (NRA) 4 hours after adding ammonium nitrogen to the nutrient solution ( $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  1:1, 2:1, 3:1). It is demonstrated that the presence of  $\text{NH}_4$  in the ambient solution inhibited nitrate uptake, but increased root NRA. Nitrate uptake decrease was proportional to the  $\text{NH}_4^+$  concentration in the ambient medium. NRA was maximum when the  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  relation is 2:1. It is concluded that there is no coordination between the process of nitrate uptake and primary assimilation of nitrate in intact plants when both forms of nitrogen are present in the medium.