

УДК 581.133.1.02:633.854.78

СУТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ НИТРАТА И АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В КОРНЯХ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Е. Е. КРАСТИНА, Б. П. РЕДДИ, М. Н. КОНДРАТЬЕВ

(Кафедра физиологии растений)

В предыдущей работе [5] мы рассматривали данные литературы и собственные результаты изучения взаимосвязи процесса поглощения растениями ионов нитрата и активности нитратредуктазы (НР) в их тканях. В наших опытах с подсолнечником было установлено, что под влиянием дополнительного внесения в среду ионов аммония в корнях уменьшается интенсивность поглощения ионов нитрата и увеличивается активность НР, что свидетельствует об отсутствии корреляции между названными процессами. Для подтверждения этого вывода мы использовали другой методический подход — сопоставляли суточные изменения поглощения ионов нитрата и активности НР у подсолнечника.

Известно, что у подсолнечника существуют суточные ритмы поглощения ионов из солей питательных растворов [4], скорости «плача» [1], выделения с пасок свободных аминокислот [3]. Сведений о суточных изменениях активности НР в корнях подсолнечника в литературе нет. Вместе с тем у других растительных объектов отмечены ритмические изменения активности этого фермента. Суточный ритм активности НР с одним дневным максимумом обнаружен, например, в листьях и корнях пшеницы [21], в корнях ячменя [7], в листьях кукурузы [11, 15], конских бобов и фасоли [16], в семядолях хлопчатника [20], в проростках озимой ржи, озимой пшеницы, тритикале [9] и риса [17]. Ритмические изменения активности НР с 2—3 максимумами в течение суток установлены в листьях кукурузы [13], ячменя [14], сои [8] и перца [18, 19], причем у последних двух объектов такие колебания сохранялись и при непрерывном освещении растений, что говорит об их эндогенном характере. В ряде случаев обнаружение ритмических изменений активности НР зависело от метода ее определения. Например, не выявлена ритмичность ферментативной активности в корнях ячменя [7, 14] и кукурузы [13] *in vitro*. Поэтому мы использовали метод определения активности НР *in vivo*.

Основная задача наших исследований — определить, существует или нет синхронность суточных колебаний интенсивности поглощения подсолнечником нитрата и активности НР в корнях.

Методика

Объектом исследований были 30-дневные (5—6 пар листьев) растения сорта Передовик, выращенные в водной культуре на питательной смеси Кнопа (источник азота — нитрат). Концентрация солей в смеси составляла сначала (12 сут) 0,2, а затем 0,5 нормы. Питательный раствор меняли каждые 7 дней, его рН доводили до 5,6 ежедневно. В смесь Кнопа вносили дополнительно следующие микроэлементы: Fe, Cu, Zn, B, Mn и Mo. Подсолнечник выращивали при контролируемых температуре ($20 \pm 1^\circ$ круглосуточно) и освещении (свет

от люминесцентных ламп ЛБЦ-30 с 6 до 22 ч, освещенность около растений 10 клк). Были проведены две серии опытов. Биологическая повторность 5-кратная.

В 1-м опыте определяли суточный ритм поглощения подсолнечником нитрата, воды и концентрацию ионов нитрата в пасоке. Варианты опыта различались концентрацией нитрата в растворе (0,85; 4,25 и 21,25 ммоль/л); содержание остальных питательных элементов было 0,5 нормы смеси Кнопа. Растения помещали на питательные растворы в 6 ч утра.

У одной группы определяли ритм поглощения воды и нитрата. Опытный период составлял 32 ч — от 6 ч до 14 ч следующих суток. Через каждые 4 ч в течение этого периода производили смену питательных растворов (исходный объем 400 мл).

Другую группу растений использовали для сбора пасоки. Экспозиция на опытных растворах (800 мл) 30 ч, после чего срезали надземную часть растения, собирали пасоку (с 12 до 16 ч) и определяли в ней концентрацию нитрата.

Во 2-м опыте устанавливали суточный ритм поглощения нитрата при одной концентрации последнего, соответствующей 0,5 нормы смеси Кнопа (4,25 ммоль/л) в течение 24 ч (с 6 ч одних до 6 ч других суток). Метод определения был таким же, как и в 1-м опыте. Параллельно измеряли активность НР в корнях. Для этого отдельные партии растений через каждые 4 ч помещали на свежий питательный раствор: после экспозиции 4 ч корни отделяли от побегов, промывали дистиллированной водой и использовали для измерения активности НР.

О поглощении воды растениями судили по изменению объема питательного раство-

ра, а нитрата — по изменению его содержания в последнем за время экспозиции. Результаты выражали в миллимолях нитрата или миллилитрах воды на 1 г сухой массы корней за 4 ч. Нитратный азот в питательных растворах и пасоке определяли колориметрическим методом [6], активность НР — по Яворскому [12]. Навеску 1 г сырых корней помещали в темную склянку, куда приливали 10 мл инкубационной среды следующего состава: 2 мл фосфатного буфера в концентрации 0,1 моль/л (рН 7,25); 5 мл KNO_3 в концентрации 0,02 моль/л; 0,5 мл 5% 1-пропанола; 2 капли хлорамфеникола в концентрации 0,5 мг/мл; 2,5 мл воды. Склянку закрывали герметично и помещали в темноту при температуре 25° на 1 ч. Нитриты окрашивали 1% сульфаниламином в 3-молярном растворе HCl и 0,02% N-1-нафтилэтилендиаминдигидрохлоридом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотокориметре «Спекол» при длине волны 540 нм. Активность НР выражали в микромолях нитрита на 1 г сырых корней за 1 ч. Аналитическая повторность 2-кратная. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты

В 1-м опыте концентрация нитратного азота влияла на проявление и параметры ритма поглощения нитрата подсолнечником, но не оказывала действия на поглощение воды (рис. 1). Пик поглощения воды приходился на период с 14 до 18 ч дня, но и в остальные часы светового периода интенсивность этого процесса была близка к максимуму. В темновой период суток она резко уменьшалась (в 7—9 раз по сравнению с дневным максимумом). Существенных различий в параметрах ритма поглощения воды между вариантами не наблюдалось (табл. 1).

При минимальной концентрации нитратного азота (0,85 ммоль/л) поглощение его растениями было практически постоянным в течение суток (рис. 1, а). При средней (4,25 ммоль) и высокой (21,25 ммоль) концентрациях нитратного азота у растений отчетливо проявлялся суточный ритм его поглощения. Причем в отличие от поглощения воды поглощение нитрата сильно варьировало в пределах светового периода: сначала оно значительно усиливалось, достигая максимума в 14—18 ч дня, а затем ослаблялось к концу фотопериода. Дальнейшее снижение интенсивности этого процесса в темновой период было выражено меньше, чем поглощения воды.

У растений двух указанных вариантов наблюдались различия в амплитуде колебаний суточного ритма поглощения нитрата. При высокой концентрации его в среде амплитуда была больше, чем при средней (табл. 1). Эти различия определялись максимумом, а не минимумом суточного ритма.

Однако суммарное поглощение нитратного азота за весь опытный период (32 ч) по этим вариантам колебалось незначительно (соответственно

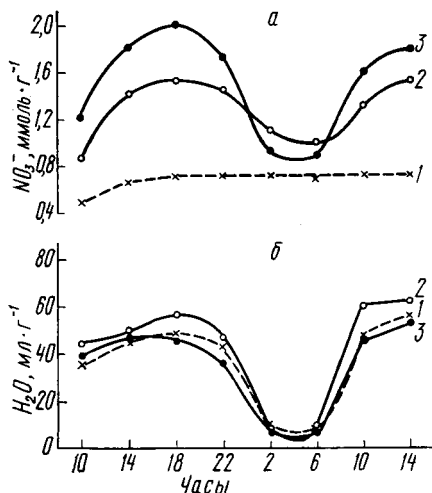


Рис. 1. Суточные ритмы поглощения ионов нитрата (а) и воды (б) растениями.

1 — концентрация нитратного азота в питательном растворе 0,85 ммоль/л; 2 — 4,25; 3 — 21,25 ммоль/л.

Т а б л и ц а 1

Некоторые параметры суточных ритмов поглощения воды и нитрата корнями подсолнечника (на 1 г сухой массы за 4 ч). Средние по двум опытам

Концентрация нитрата, ммоль/л	Максимум	Минимум	Амплитуда колебаний
Вода, мл			
0,85	48,6±3,9	6,3±0,8	21,2
4,25	55,8±4,9	6,4±0,7	24,7
21,25	47,3±2,7	5,4±0,6	21,0
Нитрат, ммоль			
4,25	1,55±0,13	0,90±0,11	0,32
21,25	2,00±0,16	0,89±0,12	0,56

в условиях наших опытов для проявления суточного ритма поглощения нитратного азота подсолнечником была достаточной концентрация 4,25 ммоль, которая, кстати, использовалась при предварительном выращивании растений (она соответствует 0,5 нормы смеси Кнопа).

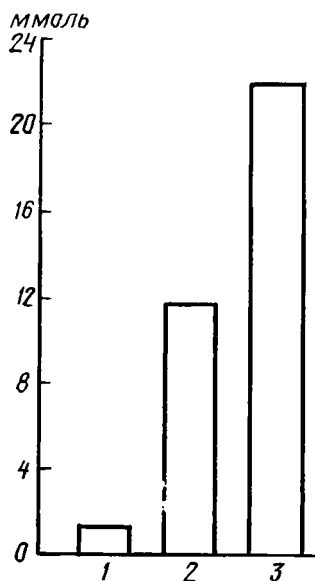


Рис. 2. Концентрация нитрата в пасоке подсолнечника. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Содержание нитратного азота в пасоке подсолнечника зависело от его концентрации в питательном растворе (рис. 2). Как снижение, так и повышение последней в 5 раз по сравнению с контролем вызывало изменение транспорта нитрата с пасокой. Поскольку пасоку собирали в часы, когда отмечался максимум в поглощении нитрата растениями, увеличение концентрации этого элемента в пасоке коррелировало с усилением его поглощения растениями по мере роста концентрации нитрата в среде.

Во 2-м опыте мы выбрали концентрацию нитратного азота в среде 4,25 ммоль исходя из того, что в этом случае у растений был хорошо выражен суточный ритм поглощения ионов нитрата и не наблюдалось избыточного транспорта последних с пасокой.

Активность НР в корнях подсолнечника сильно изменялась в течение суток. Она была небольшой в конце темного и начале светового периодов (в 6 и 10 ч утра), затем увеличивалась в 3—4 раза в середине светового периода, а к концу опять снижалась в 2 раза по сравнению с максимумом; в середине темного периода она была примерно в 1,5 раза выше, чем в конце светового периода. У растений 2-го опыта, как и в 1-м, поглощение нитрата резко уменьшалось в темновой период (рис. 3).

Итак, отмечено два максимума активности НР в корнях подсолнечника: первый — в середине светового периода, второй — в темновой период. Первый был больше и совпадал во времени с пиком поглощения нитрата растениями, второй приходился на часы, когда поглощение нитрата растениями ослаблялось. Статистическая обработка данных показала высокую достоверность обоих максимумов активности НР.

12,0 и 10,1 ммоль на 1 г сухой массы корней). При низкой концентрации нитратного азота в среде, когда суточный ритм поглощения не обнаруживался, суммарное поглощение нитрата было почти в 2 раза ниже (5,5 ммоль на 1 г). Можно полагать, что потребность растений в азоте удовлетворялась при средней концентрации нитрата в растворе, так как увеличение последней в 5 раз лишь незначительно повышало его суммарное потребление. Но при минимальной концентрации нитратного азота в среде потребность растений в азоте удовлетворялась не полностью, и, видимо, поэтому поглощение нитрата в темновой период суток не снижалось и у растений отсутствовал суточный ритм данного процесса. Таким образом,

Представляет определенный интерес сравнение параметров суточных ритмов поглощения нитрата и активности НР в корнях у подсолнечника. При этом мы принимали во внимание лишь первый (большой) максимум активности НР и минимум, приходящийся на конец темного периода суток. Амплитуду колебаний — один из главных параметров ритма — выражали не только в абсолютных величинах, но и в процентах от среднего уровня, чтобы легче было сопоставить ритмы разных процессов.

Амплитуда суточных колебаний активности НР значительно превышала амплитуду колебаний поглощения растениями нитрата (табл. 2) и составляла соответственно 62 и 26 % от среднего уровня.

Таким образом, выявлены значительные различия в суточных колебаниях поглощения нитрата подсолнечником и активности НР. В суточном ритме первого процесса существуют один максимум и один минимум, амплитуда колебаний относительно небольшая. Но у активности НР в корнях подсолнечника есть два максимума — в световой и темновой периоды, амплитуда колебания ферментативной активности, в течение суток значительно больше, чем поглощения нитрата.

В пределах светового периода изменения интенсивности поглощения ионов нитрата растениями коррелируют с изменениями активности НР в корнях, но эта корреляция может и не являться отражением внутренней координации указанных процессов. В середине светового периода интенсивность большинства физиологических функций корневой системы подсолнечника, в том числе поглощения воды и ионов питательных солей, скорости «плача», транспорта с пасокой минеральных и органических веществ, достигает максимума.

В сходных экспериментальных условиях были установлены два максимума интенсивности дыхания и содержания сахаров в корнях подсолнечника в течение суток — в середине светового и темного периодов [2]. У райграса итальянского тоже отмечены 2 максимума интенсивности дыхания корней — через 6 и 16—18 ч от начала светотемнового суточного цикла [10].

Поэтому есть основание предположить, что суточные изменения активности НР в корнях подсолнечника синхронны с изменениями интенсивности дыхания и содержания сахаров в этих органах.

Выводы

1. Суточный ритм поглощения ионов нитрата подсолнечником наблюдался при средней и высокой концентрациях нитратного азота в питательном растворе (4,25 и 21,25 ммоль/л), но отсутствовал при низкой концентрации (0,85 ммоль/л). Максимум поглощения приходился на середину светового периода, а минимум — на темновой период суток.

2. Активность нитратредуктазы в корнях подсолнечника имела два максимума в течение суток — один в середине светового периода, дру-

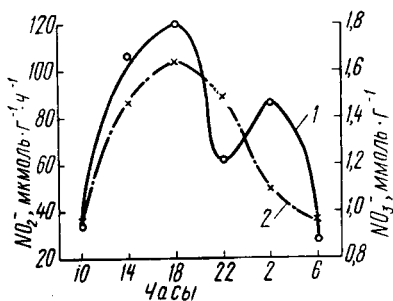


Рис. 3. Суточные изменения активности нитратредуктазы в корнях растений (1) и интенсивности поглощения ими нитрата (2).

Таблица 2
Параметры суточных ритмов поглощения нитрата и активности НР в корнях подсолнечника

Параметр	Поглощение NO_3^- , ммоль на 1 г сухой массы корней за 4 ч	Активность НР, ммоль NO_2^- на 1 г сырой массы корней за 1 ч
Максимум	$1,64 \pm 0,13$	$120,5 \pm 5,3$
Минимум	$0,96 \pm 0,12$	$28,0 \pm 2,9$
Средний уровень	1,30	74,25
Амплитуда колебаний	0,34	46,25

гой — в темновой период. Амплитуда суточных колебаний активности фермента значительно больше, чем поглощения нитрата растениями.

3. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между поглощением нитрата и активностью нитратредуктазы в корнях подсолнечника, выращенного при достаточном уровне азотного питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранецкий О. О периодичности «плача» травянистых растений и причинах этой периодичности. Спб., 1872. — 2. Владимирцева С. В. Суточная периодичность дыхания и функциональной активности корней подсолнечника. — Автореф. канд. дис. М., 1970. — 3. Гунар И. И., Крастина Е. Е., Брюшкова К. А., Беликова Е. М. О суточной периодичности в синтетической деятельности корней. — Изв. ТСХА, 1960, вып. 5, с. 19—34. — 4. Крастина Е. Е. Влияние интенсивности непрерывного освещения на проявление эндогенных компонентов в суточных ритмах поглощения подсолнечником воды и ионов питательных солей. — Изв. ТСХА, 1965, вып. 2, с. 87—95. — 5. Редди Б. П., Кондратьев М. Н., Крастина Е. Е. Изменение поглощения нитрата и активности нитратредуктазы у подсолнечника при внесении хлористого аммония в питательный раствор. — Изв. ТСХА, 1982, вып. 2, с. 12—18. — 6. Cataldo D. A., Haroon M., Schrader L. E., Youngs V. L. — Commun. Soil Sci. Plant. Anal., 1975, vol. 6, N 1, p. 71—80. — 7. Deane-Drummond C. E., Clarkson D. T., Johnson C. B. — Plant Physiol., 1979, vol. 64, N 4, p. 660—662. — 8. Duke S. H., Friedrich J. W., Schrader L. E., Koukkari W. L. — Physiol. Plant. 1978, vol. 42, N 3, p. 269—276. — 9. Godlewska E. A., Rogozinski J. — Acta Physiol. Plant., 1981, vol. 3, N 1, p. 43—49. — 10. Hansen G. K. — Physiol. Plant., 1980, vol. 48, N 3, p. 421—427. — 11. James D. R., Smith S. M. — Plant and Soil, 1976, vol. 44, N 2, p. 467—470. — 12. Jaworski E. G. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, vol. 43, N 6, p. 1274—1279. — 13. Kohl J. G., Sommerfeld E., Dudel G., Irmiler R. — Biochem. Physiol. Pflanzen, 1974, Bd 165, H. 1—2, S. 123—136. — 14. Lewis O. A. M., Watson E. F., Hewitt E. J. — Ann. Bot., 1982, vol. 49, N 1, p. 31—37. — 15. Robin P. — Physiol. Veget., 1979, vol. 17, N 1, p. 45—54. — 16. Schlesier G. — Biochem. Physiol. Pflanzen, 1977, Bd 171, H. 6, S. 511—523. — 17. Shibata M., Kabayashi M., Tokahashi E. — Plant Cell Physiol., 1969, vol. 10, N 2, p. 337—348. — 18. Steer B. T. — Plant Physiol., 1974, vol. 54, N 5, p. 762—765. — 19. Steer B. T. — Plant Physiol., 1976, vol. 57, N 6, p. 928—932. — 20. Tischler C. R., Purvis A. C., Jordan W. R. — Plant Physiol., 1978, vol. 61, N 5, p. 714—717. — 21. Upcroft J. A., Done J. — Austral. J. Plant Physiol., 1976, vol. 3, N 4, p. 421—428.

Статья поступила 27 июня 1983 г.

SUMMARY

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) was grown in water culture under the temperature of 20°, photoperiod of 16 hours and light intensity of 10.000 lux. Daily changes of nitrate absorption intensity and activity of nitrate reductase in the roots were determined in 30-days plants *in vivo*. Maximum in the middle of light time was observed in the daily rhythm of absorption of nitrate by plants at the concentration in the Knop mixture 4.25 and 21.25 mmoles. Nitrate reductase activity has two maximums: in the middle of light and dark time. A conclusion was made that sunflower has no correlation between the intensity of nitrate absorption and nitrate reductase in the roots.