

УДК 633.15:581.144.4'148:581.12

РЕУТИЛИЗАЦИЯ АЗОТА ЛИСТЬЯМИ ПРИПОЧАТКОВОЙ ЗОНЫ В РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ КУКУРУЗЫ

М. Н. КОНДРАТЬЕВ, Т. Г. САМОЙЛЕНКО, Н. Н. ТРЕТЬЯКОВ

(Кафедра физиологии растений)

В начальный период роста и развития каждого органа растения, как правило, идет активное потребление азота для формирования белков клеточных структур, а затем по достижении органом определенного возраста и после резкого снижения интенсивности синтеза начинают преобладать деструктивные процессы, в результате чего образуется много низкомолекулярных продуктов распада, в том числе и азотсодержащих [1, 2, 13]. Из стареющих органов эти продукты оттекают в молодые растущие вегетативные и репродуктивные органы.

У зерновых культур при нормальных условиях старение листьев обычно происходит в репродуктивный период. Установлено, что во время созревания зерна злаковых культур из вегетативных органов может оттекать до 60—70 % азотистых веществ [1, 3, 4, 7], причем около $\frac{2}{3}$ белков в зерне пшеницы и кукурузы способно синтезироваться за счет реутилизированного азота [3, 7, 10, 14].

Механизм перераспределения азотсодержащих соединений из стареющих органов в зерновки до сих пор неясен. Имеются данные, свидетельствующие о том, что повышенное содержание азота в вегетативных органах не всегда сопровождается более высоким содержанием белков в зерне [5, 6, 17]. Величина оттока азотистых веществ также не определяет уровень накопления белков. Так, у низкobelковых сортов пшеницы последний может быть даже несколько выше [4, 6]. Тем не менее есть основание считать, что в формировании белкового комплекса зерновки роль реутилизации азотистых веществ из вегетативных органов возрастает, когда поглощение азота из почвы корневой системой при неблагоприятных условиях внешней среды затруднено. Одними из важнейших факторов, определяющих интенсивность реутилизации азотистых соединений, являются скорость и глубина распада белков стареющих вегетативных органов, которые, в свою очередь, обуславливаются активностью в этот период «протоаз старения» [10, 17].

На ряде сортов пшеницы показано, что увеличение активности кислых протеаз тесно коррелирует с потерей азота тремя верхними листьями в период созревания зерна [10]. Так, у сортов пшеницы с повышенным содержанием азота в зерне отмечена более высокая активность протеолитических ферментов. Аналогичные результаты получены в опытах с рисом [15, 16].

У кукурузы определена протеолитическая активность при двух значениях рН — 5,4 и 7,5, при которых уменьшалось содержание белков в листьях в период развития зерновок. Установлена тесная коррелятивная связь между протеолитической активностью и убылью азотистых соединений из листьев, с одной стороны, и накоплением белков в зерне — с другой [11, 17].

Целью нашего эксперимента явилось изучение активности протеолитических ферментов и характера убыли азота из листьев, различающихся по возрасту и положению по отношению к початку, а также выяснение «вклада» этих листьев в формирование белкового комплекса зерновки.

Методика

Растения кукурузы (гибрид КВС 701) выращивали в вегетационном домике в песчаной культуре на 1,5 н. питательной смеси Арнона — Хогланда. Двухсуточные проростки, выравненные по длине корня и побега, высаживали в 6 кг полиэтиленовые сосуды, наполненные песком. Влажность песка при посеве и в период выращивания растений составляла 70 % ППВ. Половину нормы питательной смеси вносили при набивке сосудов, а оставшуюся часть — в 6 приемов при поливе в период до начала цветения метелки.

За весь вегетационный период у исследуемого гибрида формируется 15 листьев. Початок обычно закладывается один, в пазухе 9-го или 10-го листа. Изучали лист при початке, 2-й лист над початком, 2-й лист ниже початка.

Опыт был заложен 1 мая 1982 г. Отбор проб производили каждые 7 дней после начала цветения початка до фазы восковой спелости зерна. Первые пробы для анализов брали 13 июля, последние — 12 августа. Каждая проба состояла из листьев соответствующего яруса не менее чем с трех растений. Повторность опыта 4-кратная. Формирование и налив зерна кукурузы проходили при достаточно высокой температуре воздуха (в среднем среднесуточная температура была около 18°) и относительной влажности воздуха около 70 %. Наиболее высокая среднесуточная температура (21°) в исследуемый период отмечалась во второй декаде июля, во время взятия первых проб для анализа, затем наблюдалось ее некоторое понижение, к концу периода исследований она составила 17°.

При определении активности протеаз за

основу был взят метод Ансона [9]. Так как протеазы, участвующие в гидролизе белковых соединений стареющих листьев кукурузы, обладают специфическими свойствами, были проведены специальные исследования с целью определения сред выделения и инкубации данных ферментов. Для этого 2 г свежего растительного материала измельчали в ступке с жидким азотом. Затем добавляли 10 мл холодной воды и 10 мкл меркаптоэтанола и растирали со стеклом до гомогенной массы, которую фильтровали через капрон и центрифугировали при 16 000 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного препарата. Все операции по выделению ферментов проводили на холоде. К 0,5 мл 1 % раствора казеина, приготовленного либо на фосфатно-цитратном буфере (рН 5,6), либо на 0,005-молярном трис-НСl буфере (рН 7,3), прибавляли 0,1 мл ферментного препарата. Смесь инкубировали при 40° в течение 2 ч. Затем в пробирки добавляли 2 мл 10 % ТХУК, выдерживали не менее 1 ч в холодильнике и центрифугировали 20 мин при 10 000 г. В надосадочной жидкости определяли растворимые продукты гидролиза по поглощению при 280 нм на спектрофотометре СФ-26. За единицу протеолитической активности принимали количество фермента, вызывающего изменение оптической плотности на 0,0001 за 1 ч против контроля. В контрольные пробирки прибавляли ТХУК, а затем раствор, содержащий фермент. Концентрацию белков в растворе устанавливали методом Лоури [12], содержание общего азота — фотокалориметрически с использованием индофенольной зелени.

Результаты и обсуждение

Срединное расположение початка на стебле кукурузы (у КВС 701 в пазухе 9-го или 10-го листа) предопределяет достаточно жесткое распределение функций между листьями в отношении обеспечения его фотоассимилятами и азотсодержащими соединениями [8]. Однако детально это распределение еще не изучено. Известно лишь, что в зависимости от генотипа кукурузы варьирует как местоположение, так и число початков на растении. В этой связи представляет значительный интерес изучение особенностей азотного метаболизма у листьев, находящихся в непосредственной близости от початка в ходе формирования в нем зерновок.

Припочатковый лист превосходил другие листья по площади и мас-

Накопление сухой массы и азота в листьях различных ярусов припочатковой зоны растений кукурузы

Ярус листа	Площадь поверхности, дм ²	Сухая масса, г	N, мг на 1 лист		
			на 7-й день после цветения початка	в фазу восковой спелости зерна	реутилизировано
+2	4,14	1,64	55,1	31,2	23,9
0	4,60	1,96	65,6	35,2	30,4
-2	3,90	1,40	43,4	21,0	22,4

Примечание. +2 — 2-й лист над початком; 0 — при початке; -2 — 2-й лист под початком.

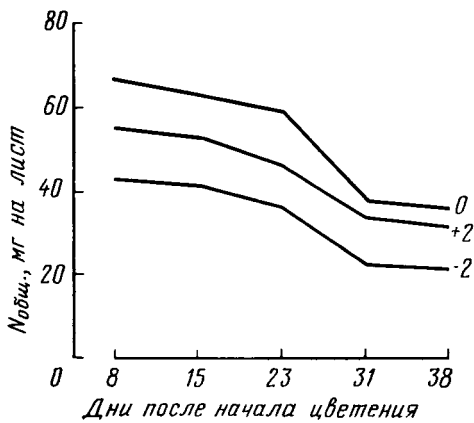


Рис. 1. Динамика содержания общего азота в листьях кукурузы припочатковой зоны.

припочаткового листа выше, чем у листьев, находящихся выше и ниже.

Интенсивность реутилизации азотистых соединений при формировании зерновок изменяется во времени и зависит от положения листа по отношению к початку (рис. 1). В течение 23 дней после начала цветения она была невысокой. В среднем листья «отдавали» 16 % азота, содержащегося в них в период выбрасывания нитей. В последующие 8 дней интенсивность оттока резко возрастала и составляла у 2-го листа над початком 26, а у 2-го листа ниже початка — 30 %. При этом, как отмечалось выше, максимальное количество азотистых веществ за исследуемый период оттекало из припочаткового листа. Из 2-го листа над и 2-го листа под початком реутилизировалось приблизительно одинаковое количество азота (таблица).

Азот листьев представлен азотом структурных белков (нерастворимые белки), белков-ферментов (растворимые белки) и небелковых растворимых соединений. Большая часть азота приходится на фракцию растворимых белков [2], содержание которой определяется комплексом внутренних и внешних факторов.

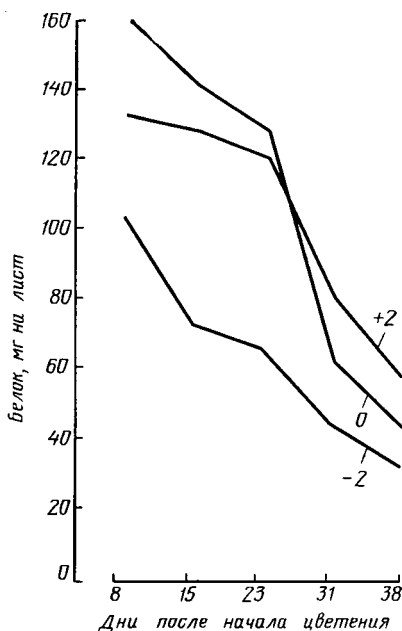


Рис. 2. Содержание растворимых белков в листьях кукурузы в репродуктивный период.

се, по истечении 7 дней после начала цветения початка в нем больше, чем в других листьях, накапливалось азотистых веществ (таблица). К фазе восковой спелости концентрация азота в этом листе оставалась наибольшей, хотя отток азота из его тканей происходил интенсивней, чем из двух других листьев. Второй лист над початком был в лучших световых условиях, тем не менее он уступал по всем изучаемым показателям листу при початке и превосходил 2-й лист под початком. Таким образом, интенсивность накопления и реутилизации азота у

припочаткового листа выше, чем у листьев, находящихся выше и ниже. Интенсивность реутилизации азотистых соединений при формировании зерновок изменяется во времени и зависит от положения листа по отношению к початку (рис. 1). В течение 23 дней после начала цветения она была невысокой. В среднем листья «отдавали» 16 % азота, содержащегося в них в период выбрасывания нитей. В последующие 8 дней интенсивность оттока резко возрастала и составляла у 2-го листа над початком 26, а у 2-го листа ниже початка — 30 %. При этом, как отмечалось выше, максимальное количество азотистых веществ за исследуемый период оттекало из припочаткового листа. Из 2-го листа над и 2-го листа под початком реутилизировалось приблизительно одинаковое количество азота (таблица).

По истечении недели после начала цветения лист, в пазухе которого находился початок, содержал максимальное количество растворимых белков (рис. 2), что говорит о его высокой функциональной активности. Наименьшее количество растворимых белков содержалось во 2-м листе под початком. В период цветения початка и формирования зерновок общее количество белков данной фракции в исследуемых листьях снижалось. Однако темпы этого снижения у листьев разных ярусов были неодинаковыми. Они в значительной мере определялись возрастом листа и положением его по отношению к початку. В течение 23 дней от начала цветения содержание растворимых белков оставалось практически неизменным лишь в листе выше початка. В припочатковом листе, так же как во 2-м листе под початком, шел их интенсивный

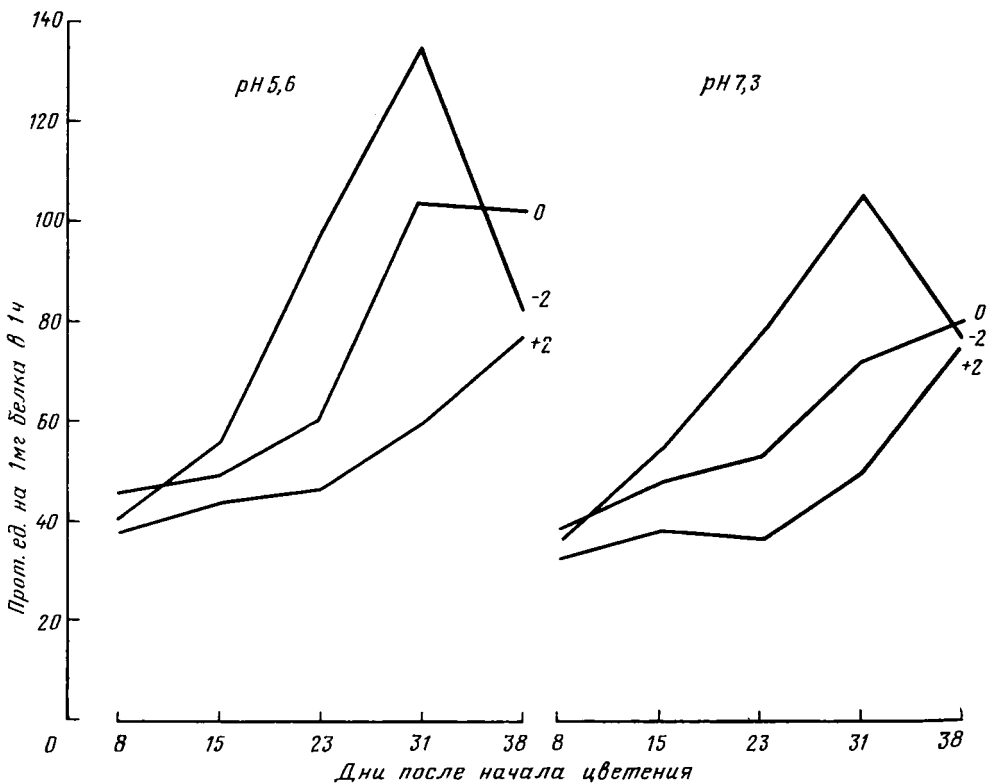


Рис. 3. Протеолитическая активность листьев кукурузы припочатковой зоны в репродуктивный период.

гидролиз сразу после выбрасывания початком тычиночных нитей (рис. 2). Следует отметить, что гидролиз растворимых белков во 2-м листе под початком в репродуктивный период происходил практически с постоянной скоростью, тогда как в листьях при и над початком он резко активизировался по истечении трех недель после начала цветения початка. В припочатковом листе максимальная скорость убыли растворимых белков отмечалась между 23-м и 31-м днями после начала цветения початка.

Таким образом, начало, длительность и интенсивность процесса распада растворимых белков листьев кукурузы в значительной степени определяется их возрастом и местоположением по отношению к початку. Наиболее устойчивыми к действию «протеаз старения» являются белки-ферменты в листьях, расположенных выше початка.

Протеолитическая активность в листьях исследованных ярусов в начале цветения початка была одинаковой (рис. 3). По мере развития зерновок и возрастания их потребности в азотистых метаболитах для формирования белкового комплекса в листьях увеличивалась активность как кислых (АКП), так и нейтральных (АНП) протеаз. Наибольшая активность протеаз наблюдалась во 2-м листе ниже початка — более старом. Пики активности АКП и АНП приходились на 31-й день после начала цветения, за неделю до наступления фазы восковой спелости зерна, после чего удельная активность протеаз в листьях этого яруса резко снижалась (рис. 2).

В припочатковом листе АКП достигала максимума и стабилизировалась на 31-й день, в то время как АНП продолжала возрастать до фазы восковой спелости зерна (38-й день после цветения). Наименьшей протеолитической активностью обладал 2-й лист над початком, самый молодой из исследованных (рис. 3). АКП и АНП этого листа были равны и достигали максимальных размеров лишь к концу эксперимента.

На основании сказанного выше можно заключить, что АКП и АНП,

характеризующие скорость распада белков листа, отражают ход старения ассимиляционного аппарата. Прослеживаются четкие изменения во времени протеолитической активности в листьях разных ярусов. Гидролиз белков начинает осуществляться раньше и с большей скоростью у 2-го листа под початком. Однако перераспределение из листьев азотистых соединений определяется не только активностью, но и длительностью функционирования протеаз в их тканях. Поэтому наибольший отток азотистых соединений происходил, как и следовало ожидать, из припочаткового листа (таблица). Для листьев разных ярусов прослеживается определенная специфика деятельности протеолитических систем. В припочатковом листе и 2-м листе под початком АКП была несколько выше АНП, во 2-м листе над початком они были равны.

Заключение

Лист, в пазухе которого располагался початок, превосходил листья других ярусов как по количеству накопленного азота, так и по интенсивности его реутилизации.

Реутилизация азотистых соединений в ходе формирования зерновки происходила не с одинаковой интенсивностью во времени, она зависела также от местоположения листа по отношению к початку. Интенсивность оттока азота возрастала с 16 до 26—38 % к исходному количеству в период между 23-м и 31-м днем после начала цветения початка.

Наиболее устойчивыми к действию «протеаз старения» являлись белки листьев, расположенных выше початка. Гидролиз белков начал осуществляться раньше и проходил с большей скоростью у листьев нижнего яруса. Количество реутилизированных из листьев азотистых соединений определялось как активностью, так и длительностью функционирования протеаз. В припочатковом листе и 2-м листе ниже початка большей активностью обладали кислые протеазы, тогда как в более молодом 2-м листе, расположенном выше початка, активность кислых и нейтральных протеаз была одинаковой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьев М. Н., Костюкович М. Ф. Физиологические аспекты формирования зерна злаковых культур. — *Агрохимия*, 1981, № 2, с. 136—145. — 2. Кретович В. Л. Обмен азота в растениях. — М.: Наука, 1972. — 3. Павлов А. Н. Накопление белка в зерне пшеницы и кукурузы. — М.: Наука, 1967. — 4. Павлов А. Н. Об оттоке азота из вегетативных органов в зерно пшеницы и кукурузы. — *С.-х. биология*, 1969, т. 4, № 2, с. 230—235. — 5. Павлов А. Н., Колесник Т. И. О причинах, определяющих различный уровень накопления белка в зерне высоко- и низкобелковых сортов пшеницы. — *Физиология растений*, 1974, т. 21, вып. 2, с. 329—334. — 6. Павлов А. Н., Чергинцев Б. И. Условия минерального питания и формирование качества зерна тритикале. Сообщ. 2. Факторы, определяющие повышенное содержание белка в зерне тритикале. — *Агрохимия*, 1980, № 4, с. 89—95. — 7. Павлов А. Н. Физиологические причины, определяющие уровень накопления белка в зерне различных генотипов пшеницы. — *Физиология растений*, 1982, т. 29, вып. 4, с. 767—779. — 8. Allison J. C. S. — *Ann. Appl. Biol.*, 1984, vol. 104, N 2, p. 357—363. — 9. Anson M. L. — *J. Gen. Physiol.*, 1938, vol. 22, N 1, p. 79—86. — 10. Dalling M. I., Boland G., Wilson J. H. — *Aust. J. Plant Physiol.*, 1976, vol. 3, N 6, p. 721—730. — 11. Feller U., Soong F. S. T., Hageman R. H. — *Plant Physiol.*, 1977, vol. 59, N 2, p. 290—294. — 12. Lowry O. H., et al. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265—267. — 13. Mae T., Ohira K. — *Plant Cell Physiol.*, 1981, vol. 22, N 6, p. 1067—1074. — 14. Nair T. V. R., Abrol I. P., Grover H. L. — *Physiol. Plantarum*, 1978, vol. 42, N 3, p. 293—299. — 15. Peres C. M., Cagampang G. B., Esmama B. V. — *Plant Physiol.*, 1973, vol. 51, N 3, p. 537—542. — 16. Rao S. C., Croy L. J. — *J. Agric. Food Chem.*, 1972, vol. 20, N 8, p. 1138—1141. — 17. Reed A. J., Below F. F. — *Plant Physiol.*, 1980, vol. 66, N 1, p. 164—170.

Статья поступила 22 июня 1985 г.