

УДК 581.13

НИТРАТРЕДУЦИРУЮЩАЯ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ В РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД

М. Н. КОНДРАТЬЕВ, О. И. ТАНЦОВА

(Кафедра физиологии растений)

В вегетационном опыте изучалось влияние удаления колоса на общий ход старения и обменных процессов у растений яровой пшеницы сорта Московская 35 в репродуктивный период. Нарушение донорно-акцепторных связей существенно замедляло темпы старения растений: снижалась скорость деструкции хлорофиллов, задерживалось пожелтение и подсыхание листьев, оставался высоким уровень нитратредуктазной активности, замедлялся рост протеолитической активности верхних листьев. У опытных растений отмечено заметное увеличение сухой массы вегетативных органов. После удаления колоса вначале основным местом накопления метаболитов становился стебель, в дальнейшем эта роль переходила к корневой системе. Удаление колоса не сказывалось на оттоке фотоассимилятов в другие органы. Установлено, что поступление углеводов и азотистых веществ в зерновки зависит как от аттрагирующей способности, так и от общего хода старения растений.

Содержание белка в зерне — важнейший показатель качества урожая злаковых культур, и в частности пшеницы. При изучении физиолого-биохимических особенностей формирования белкового комплекса зерна установлено, что азотистые вещества, из которых образуются запасные белки зерна, поступают в него из двух источников: из вегетативных органов вследствие реутилизации (распада белков, сформированных до цветения), а также из корней (поглощение азотистых соединений корневой системой в период налива зерновок) [1, 3]. Соотношение поступления этих соединений из указанных источников неодинаково на разных этапах формирования зерновок и определяется комплексом внутренних и внешних факторов. Одним из возможных подходов к определению источника формирования белкового комплекса зерна является изучение процессов ассимиляции и реутилизации азота в растениях, что позволит наметить ряд биохимических тестов, с помощью которых в селекционной практике можно выводить высокобелковые сорта важнейших продовольственных зерновых культур.

Оба названные процесса, обеспечивающие накопление белков в зерновках, являются каталитическими: ассимиляция азота, поглощенного растением, определяется уровнем нитратредуцирующей активности, и этот процесс является анаболическим, в то время как ремобилизация азота из листьев происходит в результате деятельности протеаз, гидролизующих белки вегетативных органов по мере их старения, и является катаболическим процессом.

Сведения об изменении нитратредуцирующей активности (НРА) в процессе старения растений немногочисленны. Показано, что по мере старения НРА снижается в листьях ячменя [24], кукурузы, овса и табака [28]. В листьях фасоли по мере роста и развития листьев она увеличивается, достигает максимума на этапе их полного развертывания, затем в ходе старения быстро падает [25]. В исследованиях с пшеницей и ячменем установлено, что для каждого яруса листьев

характерно определенное максимальное значение удельной НРА, которое достигается в момент полного развития листа данного яруса [5].

В ряде работ предпринята попытка выявить связь НРА в листьях растений с содержанием в зерне белков [11, 22]. Высокие коэффициенты корреляции между этими показателями были получены в период закладывания и развития початка у кукурузы, а также в фазы колошения и цветения у пшеницы. Удаление початка у кукурузы привело к более быстрому снижению удельной НРА в листе под початком [9].

Связь протеолитической активности (ПА) стареющих листьев с ремобилизацией из них азота проявлялась более четко. В модельных опытах с отделенными листьями овса, риса, пшеницы [13, 17, 19] отмечен рост ПА в тканях листьев по мере их старения при одновременном уменьшении содержания белка. В процессе старения интактных растений пшеницы [14], кукурузы [15], зернобобовых культур [26, 27] также установлена тесная связь ПА с убылью азота из листьев, что говорит в пользу участия протеаз в гидролизе белков стареющих листьев. В то же время остается малоизученным вопрос о специфике действия на белки листьев нейтральных и кислых протеаз. Кроме этого, наличие связи между ростом ПА и оттоком азота из вегетативных органов подтверждается не во всех исследованиях [16], а на растениях риса даже выявлена обратная связь между этими показателями [8].

Большой научный интерес представляет изучение регуляторных механизмов функционирования «протеаз старения», в частности выяснение, что является причиной включения протеаз в работу — старение того или иного вегетативного органа или аттрагирующая способность репродуктивного органа. Существует мнение, что аттрагирующая способность зерновки определяет в большей степени поступление углеводов, чем азотистых веществ [2]. Изучение в период старения растений процессов поступления азота и его реутилизации в связи с аттрагирующим действием зерновок направлено на выявление донорно-акцепторных отношений, существующих между вегетативными и репродуктивными органами. Данных о взаимосвязи основных ферментов процессов ассимиляции и реутилизации азота (взаимосвязь НРА и ПА листьев) в период формирования зерновок недостаточно. Имеются лишь указания о наличии обратной связи между НРА и ПА листьев кукурузы и пшеницы в репродуктивный период [22, 23]. Нарушение донорно-акцепторных отношений между вегетативными и репродуктивными органами при удалении колоса выражается в задержке роста активности эндопептидаз и оттоке азота из флагового листа [12], в то время как удаление початка усиливает рост активности эндопептидаз и убыль азота из листа ниже початка [9].

Целью настоящего исследования было изучить характер динамики НРА и ПА листьев верхних ярусов пшеницы, общего хода старения и обменных процессов растений при нарушении донорно-акцепторных связей между вегетативными и репродуктивными органами.

Методика

Растения яровой пшеницы (сорт Московская 35) выращивали в феврале — апреле 1985 г. в светлом отсеке теплицы в песчаной культуре (пластиковые сосуды на 6 кг, 10 растений на сосуд) на 1,5 н. смеси Арнона — Хогланда [6] (16-часовой светопериод, температура $20 \pm 1^\circ$ круглосуточно). Досвечивание осуществляли с помощью ламп ДРЛФ 400-1. Побеговощения, а также боковые побеги, развивавшиеся после удаления колоса, периодически срезали. На 5-й день после начала цветения у растений опытного варианта удаляли колос и с этого момента до начала восковой спелости зерна проводили сравнение контрольных и опытных ра-

стений по изменению НРА, ПА и общего хода старения. Пробы растений отбирали с интервалом 6—7 дней (биологическая повторность 2-кратная, в каждую повторность входило 10 растений; аналитическая — 2—4-кратная). Растения расчленились на колос, флаговый лист, 2-й лист сверху, нижние листья, стебель, корей. В исследуемых органах определяли ПА, НРА, содержание хлорофилла, общего азота, углеводов. При расчете сухой массы, содержания общего азота, углеводов использовали средние пробы соответствующих органов растений.

Активность НРА устанавливали *in vivo* вакуум-инфильтрацией KNO_3 по методу

Мульдера [21] с последующим определением количества образующихся ионов NO_2^- — с помощью реактива Грисса. Активность протеаз исследовали с использованием казеина в качестве субстрата при pH 5,4 и 7,5 методом Ансона [7]. Растворимые белки определяли методом Лоури [18],

хлорофиллэкстракцией 96 % этанолом с последующим измерением оптической плотности при 649 и 665 нм, углеводы — методом Дюбойса с сотр. [10], общий азот — колориметрическим методом с индофенольной зеленью [4]. В статье приведены средние данные по двум повторениям.

Результаты

Наблюдения за растениями опытного и контрольного вариантов в течение экспериментального периода показали, что удаление колоса замедляет старение. Листья (особенно нижние) и стебель опытных растений желтели и подсыхали значительно медленнее, чем контрольных. У растений опытного варианта заметно усиливался рост боковых побегов.

Содержание зеленых пигментов в тканях растений является одним из основных физиологических показателей, с помощью которых можно характеризовать ход старения* в целом. Нами была прослежена динамика содержания хлорофиллов в двух верхних листьях (рис. 1). После начала цветения содержание хлорофиллов в листьях контрольных растений интенсивно снижалось, причем более активно этот процесс протекал во 2-м листе сверху. Удаление колоса главного побега привело к существенному снижению темпов разрушения зеленых пигментов. Особенно заметно это было между 11-м и 18-м днем после начала цветения (во флаговом листе данный процесс протекал более длительно). Однако между 18-м и 25-м днем после начала цветения темпы разрушения хлорофиллов в листьях опытных растений были более высокими, чем в контроле, особенно во 2-м листе сверху. К 32-му дню после начала цветения скорость разрушения хлорофиллов у контрольных и опытных растений выравнивалась.

Таким образом, удаление колоса главного побега приводило к снижению темпов разрушения пигментного аппарата листьев, что можно расценивать как некоторую приостановку старения растений. Этот эффект в большей мере проявлялся у флагового листа. Замедление хода

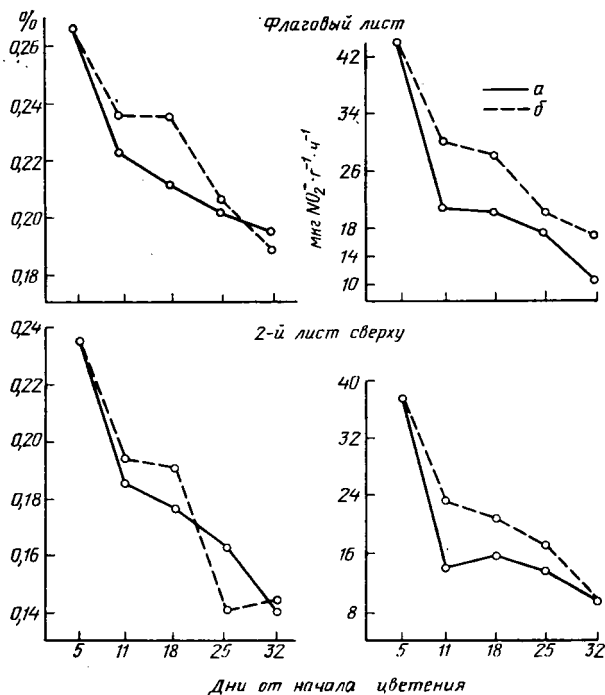


Рис. 1. Динамика нитратредуцирующей активности (справа) и содержания хлорофилла в листьях пшеницы в репродуктивный период (в расчете на сырую массу). а — контроль; б — опыт.

Сухая масса (г/растение) контрольных (числитель) и опытных (знаменатель) растений пшеницы в период репродуктивного развития

Орган растения	Дни после начала цветения				
	5	11	18	25	32
Листья	0,61	$\frac{0,59}{0,62}$	$\frac{0,62}{0,70}$	$\frac{0,61}{0,74}$	$\frac{0,56}{0,66}$
Стебель	1,29	$\frac{1,37}{1,44}$	$\frac{1,39}{1,48}$	$\frac{1,53}{1,83}$	$\frac{1,59}{1,76}$
Надземная часть	2,40	$\frac{2,72}{2,06}$	$\frac{2,97}{2,18}$	$\frac{3,41}{2,57}$	$\frac{3,73}{2,42}$
Корни	1,72	$\frac{1,82}{1,28}$	$\frac{1,58}{1,22}$	$\frac{1,02}{2,04}$	$\frac{1,16}{2,32}$

старения проявилось и во 2-м листе сверху, однако оно было более кратковременным и в последующем (между 18-м и 25-м днем) сопровождалось резким увеличением скорости деструкции хлорофиллов (рис. 1).

Сухая масса листьев контрольных растений в течение 25 дней после начала цветения практически не изменялась, а затем начинала незначительно убывать (табл. 1). В опытном варианте этот показатель в течение 25 дней после начала цветения заметно возрастал, после чего также начинал снижаться. Таким образом, видимый отток пластических веществ из листьев растений обоих вариантов обозначился в одно и то же время, однако масса листьев опытных растений в течение всего периода эксперимента была значительно больше, чем у контрольных, что свидетельствует о накоплении в них метаболитов в связи с отсутствием акцептора (колоса). В период репродуктивного развития сухая масса стебля возрастала у растений обоих вариантов, однако у растений с удаленным колосом — значительно интенсивнее, чем в контроле. По истечении 25 дней после начала цветения у опытных растений этот показатель начал уменьшаться. Следует отметить, что до начала восковой спелости у контрольных растений не происходило заметной реутилизации веществ из стебля. Это свидетельствует о том, что осевой орган пшеницы лишь до определенного времени может заменять органы притяжения метаболитов и служить их вместилищем. Сухая масса корней контрольных растений уменьшалась в течение всего периода налива зерна, тогда как у опытных — лишь до 18-го дня после начала цветения, а затем резко возрастала и к фазе восковой спелости была в 2 раза больше, чем в контроле. Таким образом, удаление колоса сначала вызывало заметное снижение массы корневой системы и увеличение массы вегетативных органов, и особенно стебля. Последний вследствие отсутствия генеративного органа выполнял роль временного вместилища метаболитов, образующихся в листьях. В дальнейшем возрастала аттрагирующая роль корней, очевидно, вследствие усиленного роста боковых побегов. Корни становились основным депонирующим органом, кроме того, в них происходил синтез веществ для обеспечения роста боковых побегов.

Сухая масса надземных органов контрольных растений к концу экспериментального периода увеличивалась приблизительно в 1,5 раза, в то время как сухая масса опытных растений оставалась на исходном уровне (табл. 1), так как удаление колоса главного побега вызывает усиленное перераспределение фотоассимилятов в корневую систему, при этом, возможно, часть метаболитов выделяется через корни в среду. Не исключено, что отсутствие прироста сухой массы надземных органов при удалении колоса связано с ингибированием ассимиляционных процессов, как отмечалось в аналогичных опытах с другими видами растений [9, 20].

Содержание углеводов (мг/орган) у контрольных (числитель) и опытных (знаменатель) растений пшеницы в репродуктивный период

Орган растения	Дни после начала цветения				
	5	11	18	25	32
Листья	33,4	$\frac{29,9}{32,3}$	$\frac{42,1}{46,9}$	$\frac{54,3}{59,2}$	$\frac{70,2}{76,8}$
Стебель	81,9	$\frac{72,2}{98,3}$	$\frac{77,1}{133,3}$	$\frac{149,0}{222,2}$	$\frac{155,7}{331,1}$

В период формирования зерновок содержание растворимых углеводов в листьях и стеблях контрольных и опытных растений постоянно возрастало (табл. 2), причем в листьях опытных растений их накапливалось несколько больше, чем в контроле (на 5—7 мг). Однако этот факт не позволяет объяснить существенную разницу между вариантами в накоплении листьями сухой массы (табл. 1). Следовательно, можно утверждать, что удаление колоса не сказывается на оттоке ассимилятов из листьев в другие органы. Существенное же увеличение массы самих листьев может быть связано с накоплением в клетках мезофилла крахмала и (или) задержкой оттока азотсодержащих метаболитов. Обратный эффект наблюдался при удалении початка у кукурузы, в листьях которой происходило усиленное накопление водорастворимых углеводов при одновременном угнетении фотосинтеза [9]. Стебли опытных растений накапливали углеводов значительно больше и начиная с 18-го дня после начала цветения растений содержали их в 1,5—2 раза больше, чем в контроле. Таким образом, значительное усиление роста сухой массы стебля у опытных растений по отношению к контролю (табл. 1) происходит в основном за счет накопления углеводов.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что нарушение донорно-акцепторных отношений между вегетативными и репродуктивными органами приводит к заметным изменениям как хода метаболизма, так и транспорта углеводов у растений пшеницы. Наблюдения за динамикой содержания хлорофиллов в надземных органах показали,

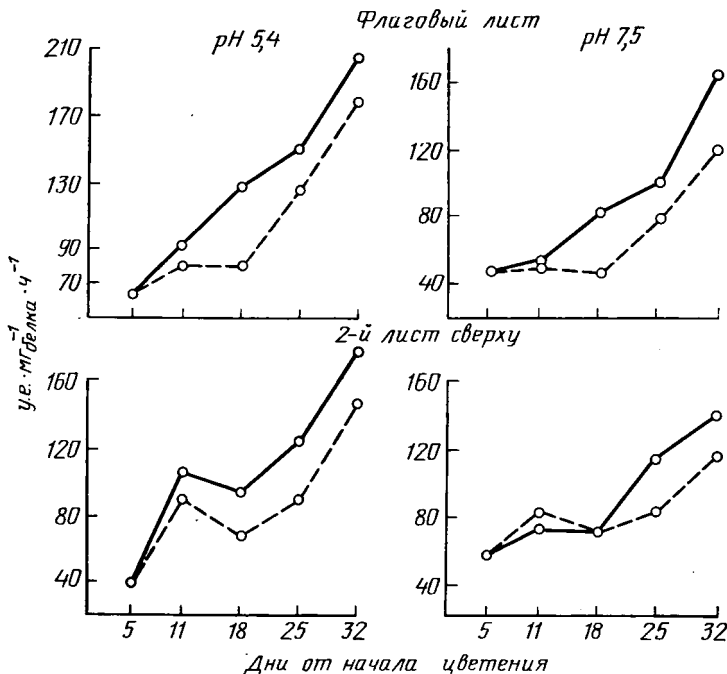


Рис. 2. Динамика протеолитической активности листьев пшеницы в репродуктивный период. Обозначения те же, что на рис. 1.

что нарушение связей донор—акцептор оказывает более широкое последствие на физиологические функции растительного организма, в частности приводит к изменению темпов его старения. Об этом свидетельствует характер протекания процессов ассимиляции нитратной формы азота и гидролиза белков листьев в репродуктивный период развития контрольных и опытных растений (рис. 1, 2).

НРА в листьях пшеницы в первые 11 дней после начала цветения снижалась более резко, чем в последующий период развития. При этом во флаговом листе ее уровень был более высоким, чем во 2-м листе сверху. По истечении 32 дней после начала цветения различия в НРА между листьями обоих ярусов исчезали.

Удаление колоса главного побега снижало темпы спада НРА в листьях обоих ярусов. Особенно сильно нарушение связей донор—акцептор сказалось на уровне НРА во 2-м листе сверху в период между 11-м и 25-м днем, во флаговом листе — по истечении 11 дней от начала цветения и до конца эксперимента (рис. 1). Эффект «поддержания» НРА был больше во флаговом листе, что говорит о большей мобильности в нем нитратредуцирующей системы. Следует отметить, что повышение уровня НРА в листьях опытных растений по отношению к контролю хорошо согласуется с замедлением процесса старения фотосинтетического аппарата, о котором можно судить на основании данных о динамике хлорофилла (рис. 1) и накоплении сухой массы листьев (табл. 1). Замедление снижения НРА в листьях растений с удаленным колосом, по нашему мнению, может быть связано с усилением поглощения и транспорта нитрата в листьях как ответной реакцией на утрату генеративного органа (проявление репарации).

Во флаговом листе контрольных растений активность кислых (АКП) и нейтральных (АНП) протеаз по мере созревания зерновок возрастала, причем первая была выше второй, и темпы повышения ее были более быстрыми.

Во 2-м листе сверху исходный уровень АКП был ниже, чем во флаговом листе, однако исходные уровни АНП этих листьев были одинаковыми. Нарастание активности протеаз во 2-м листе в ходе формирования зерна имело нелинейный характер (рис. 2), причем, как и во флаговом листе, общий уровень АКП был больше. Особенно высокая активность кислых протеаз отмечена между 5-м и 11-м днем и после 18-го дня от начала фазы цветения. АНП возрастала спустя 18 дней после начала цветения.

Удаление генеративного органа в целом приводило к заметному уменьшению активности протеаз в листьях обоих ярусов. Однако снижение их шло неравномерно и зависело как от яруса листа, так и вида протеолитических ферментов (рис. 2). Так, АКП уменьшалась сильнее, чем АНП; снижение активности протеаз во флаговом листе оказалось больше, чем во 2-м сверху, т. е. при нарушении донорно-акцепторных связей «протеазы старения» ингибировались сильнее в более молодом листе. Особенно четко это проявляется при наблюдении за динамикой АНП. Следовательно, донорно-акцепторные связи ослабевают по мере удаления листа от колоса, а также с возрастом листа. Отток метаболитов из листьев зависит как от аттрагирующей способности зерновки, так и от общего хода старения вегетативных органов в период репродуктивного развития.

Заключение

Нарушение донорно-акцепторных отношений у пшеницы при удалении колоса главного побега приводит к существенному замедлению темпов старения растений: снижается скорость деструкции хлорофиллов, задерживается пожелтение и подсыхание листьев, возрастает нитратредуктазная активность и снижается активность «протеаз старения» флагового и 2-го сверху листьев, заметно увеличивается сухая масса вегетативных органов. Вместе с тем стебель может служить вместили-

шем метаболитов лишь на начальных этапах репродуктивного периода. В дальнейшем возрастает аттрагирующая роль корней, очевидно, вследствие усиленного роста боковых побегов. Корни становятся основным депонирующим органом. Кроме того, в них происходит активный синтез веществ для растущих боковых побегов. Таким образом, нарушение донорно-акцепторных отношений приводит к возникновению новых центров притяжения пластического материала. Удаление колоса не сказывается на оттоке фотоассимилятов из листьев в другие органы: углеводы распределяются между стеблем и корнями растений.

Более высокий уровень нитратредуцирующей активности в листьях опытных растений можно объяснить усилением поглощения и транспорта нитрата в листья как ответной реакцией на утрату генеративного органа. Снижение протеолитической активности при удалении генеративного органа идет неравномерно и зависит как от яруса (возраста) листа, так и вида протеолитических ферментов. Поступление углеводов и азотистых веществ в зерновку определяется аттрагирующей способностью колоса и общим ходом старения растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьев М. Н., Костюков и ч М. Ф., Физиологические аспекты формирования белкового комплекса зерна злаковых культур. — *Агрохимия*, 1981, № 2, с. 136—145. — 2. Коновалов Ю. В. Формирование продуктивности колоса яровой пшеницы и ячменя. — М.: Колос, 1981. — 3. Павлов А. Н. Об оттоке азота из вегетативных органов в зерно у пшеницы и кукурузы. — С.-х. биология, 1969, вып. 4, № 2, с. 230—235. — 4. Самохвалов С. Г., Прижуква В. Г., Кондратьев М. Н. Определение азота в растениях с использованием индофенольной зелени. — *Химия в сельск. хоз-ве*, 1976, вып. 14, № 7, с. 71—73. — 5. Филиппова Г. И., Токаре в Б. И. О распределении НРА по листьям разных ярусов у пшеницы и ячменя. — *Науч.-техн. бюл. Сиб. НИИ химизации сельск. хоз-ва*, 1976, вып. 18, с. 38—41. — 6. Хьюитт Э. Песчаные и водные культуры в изучении питания растений. — М., ИЛ, 1960. — 7. Апсон М. Л. — *J. Gen. Physiol.*, 1938, vol. 22, N 1, p. 79—89. — 8. Cheng S. H., Kao C. H. — *Physiol. Plant.*, 1984, vol. 62, N 2, p. 231—237. — 9. Christensen L. E., Below F. E., Hageman R. H. — *Plant Physiol.*, 1981, vol. 68, N 5, p. 1180—1185. — 10. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. a. o. — *Anal. Chem.*, 1956, vol. 18, p. 350—356. — 11. Eilrich G. L., Hageman R. H. — *Crop. Sci.*, 1973, vol. 13, N 1, p. 59—66. — 12. Feller U. — *Plant Cell Physiol.*, 1979, vol. 20, N 8, p. 1577—1583. — 13. Feller U. K. — *Physiol. Veg.*, 1983, vol. 21, N 1, p. 93—102. — 14. Feller U., Erisшапп К. Н. — *Z. Pflanzphysiol.*, 1978, Bd 90, N 3, S. 235—244. — 15. Feller U. K., Song T.-S. T., Hageman R. H. — *Plant Physiol.*, 1977, vol. 59, N 2, p. 290—294. — 16. Friedrich J., Huffaker R. C. — *Plant Physiol.*, 1980, vol. 65, N 6, p. 1103—1107. — 17. Kar M., Mishra D. — *Biol. Plant.*, 1977, vol. 19, N 5, p. 365—369. — 18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., a. o. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275. — 19. Martin C., Thimann K. V. — *Plant Physiol.*, 1972, vol. 49, N 1, p. 64—71. — 20. Mondal M. H., Brun W. A., Brenner M. L. — *Plant Physiol.*, 1978, vol. 61, p. 394—397. — 21. Mulder E. G., Boxma R., Van Veen W. L. — *Plant Soil.*, 1959, vol. 10, N 4, p. 335—355. — 22. Rao S. G., Croy L. J. — *J. Agr. Food Chem.*, 1972, vol. 8, p. 1138—1141. — 23. Reed A. G., Below F. E., Hageman R. H. — *Plant Physiol.*, 1980, vol. 66, N 1, p. 1164—1168. — 24. Schrader L. E., Cataldo D. A., Peterson D. M. a. o. — *Physiol. Plant.*, 1974, vol. 32, N 4, p. 337—341. — 25. Streit L., Feller U. — *Z. Pflanzenphysiol.*, 1982, Bd 3, S. 273—281. — 26. Weckenmann D., Martin P. — *Z. Pflanzenphysiol.*, 1981, Bd 104, N 2, S. 103—108. — 27. Wittenbach V. A., Ackerson R. G., Giaquinta R. T. a. o. — *Crop. Sci.*, 1980, vol. 20, N 2, p. 225—231. — 28. Zieserl J. F., Rivenbark W. L., Hageman R. H. — *Crop. Sci.*, 1963, vol. 3, p. 27—32.

Статья поступила 14 июля 1986 г.

SUMMARY

In the greenhouse experiment, the effect of ear removal on general ageing and on metabolism processes in spring wheat plants of Moskovskaja 35 variety during period of reproduction was studied. Upsetting the "donor-acceptor" balance resulted in higher dry weight of vegetative organs and did not produce any effect on the flowing of photo-assimilates from leaves into other organs. Lower rate of chlorophyll destruction, higher level of the nitrate-reducing activity, slowing down the increase in proteolytic activity are the evidence of less intensive ageing of the experimental plants. Attractive role of the ear only to some extent controls the processes of flowing the metabolites away from the leaves of wheat.