

УДК 581.131

ВПЛИВ УМОВ АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЛИСТКАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Т.П. МАМЕНКО, І.М. ШЕГЕДА, В.М. ПОЧИНОК, Л.В. СЕНІНА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: t_matenko@ukr.net*

У результаті виконаних досліджень встановлено, що недостатнє забезпечення озимої пшениці азотом у ґрунті індукує розвиток стреспротекторних реакцій у рослинах, про що свідчить підвищення рівня пероксиду водню та активності антиоксидантних ферментів у листках. Позакоренева обробка озимої пшениці карбамідом окрім азотного живлення обговорюється, з одного боку, як своєрідний стрес для рослин, з іншого — як чинник, що стимулює запуск захисних механізмів, зокрема й активацію роботи антиоксидантних ферментів. Це сприяє ліпшій реалізації генетичного потенціалу продуктивності сортів озимої пшениці високобілкового спрямування.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., супероксиддисмутаза, глутатіонредуктаза, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, пероксид водню, карбамід, азот.

Світовий і вітчизняний досвід підтвердив, що в сучасних умовах досягнути помітного підвищення врожайності та якості зерна озимої пшениці можна на основі комплексного підходу до розробки і впровадження адаптивних систем землеробства, екологічних технологій вирощування з урахуванням ґрунтово-кліматичних умов [6, 11, 16].

Удосконалення технологій вирощування, збалансування систем живлення, досягнення високих коефіцієнтів засвоєння елементів живлення — важливі складові підвищення врожайності поряд зі створенням нових сортів із високим генетичним потенціалом продуктивності [7]. При вирощуванні пшениці потрібно враховувати безліч чинників, що впливають не тільки на її продуктивність, а й на якість зерна. Зокрема, якість зерна великою мірою залежить від генетичного потенціалу сорту, ґрунтово-кліматичних умов вирощування, системи удобрення пшениці тощо [1, 11, 13, 17].

Мінеральні добрива — ефективний засіб підвищення хлібопекарських властивостей борошна, крім того, вони поліпшують його якість. Внесення добрив має стати невід'ємною складовою частиною комплексу заходів, спрямованих на поліпшення якості зерна пшениці [1, 7].

При застосуванні мінеральних добрив особливої уваги слід звертати на забезпечення пшениці азотом. Їх необхідно вносити так, щоб рослини були забезпечені азотом постійно і в достатній кількості протягом вегетації [1, 13, 17]. Білок у зерні формується в результаті мобілізації азотвмісних сполук зі стебел і листків рослин. Встановлено, що за

надмірних доз азоту спостерігається тенденція до зниження як маси 1000 зернин, так і натури, причому найменші показники отримано в разі застосування найвищої дози мінерального добрива. Зовсім по-іншому різні дози азотного підживлення впливають на вміст клейковини: з підвищенням норми мінерального добрива її вміст збільшується [1, 2, 9].

Сільськогосподарська практика знає чимало способів і строків внесення різних доз добрив, однак треба знайти такі прийоми, які б дали можливість раціонально використовувати кожен кілограм добрив і отримувати від нього найбільшу віддачу [5]. Тому основним завданням розвитку сільського господарства на сучасному етапі є досягнення найліпших результатів за найменших затрат. Сьогодні питання щодо рентабельності набуває дедалі більшого значення, оскільки це важливий економічний показник, який характеризує результати господарської діяльності [1, 5, 10, 12, 16].

Метою нашої роботи було вивчення впливу різного рівня азотного живлення у ґрунті та позакореневої обробки карбамідом на активність антиоксидантних ферментів і формування зернової продуктивності у сортів озимої пшениці.

Методика

Об'єктами дослідження обрано сорти озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, які відрізнялись за генетичним потенціалом зернової продуктивності. Астарта — високоінтенсивний сорт урожайного спрямування, Київська остиста і Малинівка — високобілкові сорти інтенсивного типу універсального використання. Рослини озимої пшениці вирощували у вегетаційних посудинах Вагнера місткістю 10 кг на темно-сірому опідзоленому ґрунті з використанням оптимального ($N_{160}P_{160}K_{160}$) і низького ($N_{32}P_{32}K_{32}$ мг/кг ґрунту) фону мінерального живлення за оптимального водозабезпечення і природного освітлення. У фази кінець цвітіння—початок молочно-воскової стиглості озиму пшеницю обприскали розчином карбаміду концентрацією 3 % з розрахунку 7 кг діючої речовини на 1 га.

Для досліджень відбирали прапорцеві листки озимої пшениці на 7-му добу після позакореневої обробки рослин.

Вміст пероксиду водню (H_2O_2) визначали за кольоровою реакцією з роданідом калію спектрофотометрично за довжини хвилі 480 нм [15]. Його концентрацію встановлювали за калібрувальним графіком, побудованим за відомими концентраціями H_2O_2 , у наномолях на 1 г сирої речовини.

Для отримання ферментного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали у ступці з 4 мл охолодженого 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,5), який містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 5мМ β -меркаптоетанол, 1 % (м/о) полівінілпіролідон. Гомогенат центрифугували за 10 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Надосадову рідину використовували для спектрофотометричного визначення активності ферментів.

Активність аскорбатпероксидази (АПО) встановлювали за зменшенням оптичної густини за довжини хвилі 290 нм протягом 1 хв в результаті окиснення аскорбату (коефіцієнт екстинкції $E = 2,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [14], активність гваяколпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.7) — за збільшенням оптичної густини за 470 нм протягом 1 хв в результаті окиснення

гваяколу (коефіцієнт екстинкції $E = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [9], активність глутатіонредуктази (ГТР) (КФ 1.6.4.2) — за зменшенням оптичної густини за довжини хвилі 340 нм протягом 2 хв у результаті окиснення НАДФ·Н (коефіцієнт екстинкції $E = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) за наявності окисненого глутатіону [18]. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за здатністю ферменту інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолію. Оптичну густину вимірювали за 560 нм. За одиницю активності СОД брали кількість ферменту, яка необхідна для інгібування фотодновлення нітросинього тетразолію на 50 % [12].

Вміст сумарного розчинного білка у ферментному екстракті визначали за методикою Бредфорда [8]. Повторність визначень — шестиразова, обліку продуктивності — по 4 посудини на варіант із розрахунку по 16 рослин у кожній посудині. Отримані дані оброблено статистично за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Встановлено, що за низького рівня азоту в ґрунті у сортів озимої пшениці підвищувався рівень пероксиду водню в листках, що свідчило про розвиток окиснювальних процесів і перехід клітинного метаболізму рослин у стресорний стан (рис. 1). При цьому найвищий рівень пероксиду зафіксовано у рослин озимої пшениці сорту Астарта порівняно з іншими сортами як за нестачі азоту в ґрунті, так і за оптимального живлення азотом. Це вказує на певні генотипні відмінності перебігу метаболізму в рослин цього сорту від двох інших сортів.

Позакоренева обробка рослин карбамідом індукувала зниження вмісту пероксиду водню в листках сорту Астарта як за нестачі, та і за оптимального рівня азоту в ґрунті. У сортів Київська остиста та Малинівка

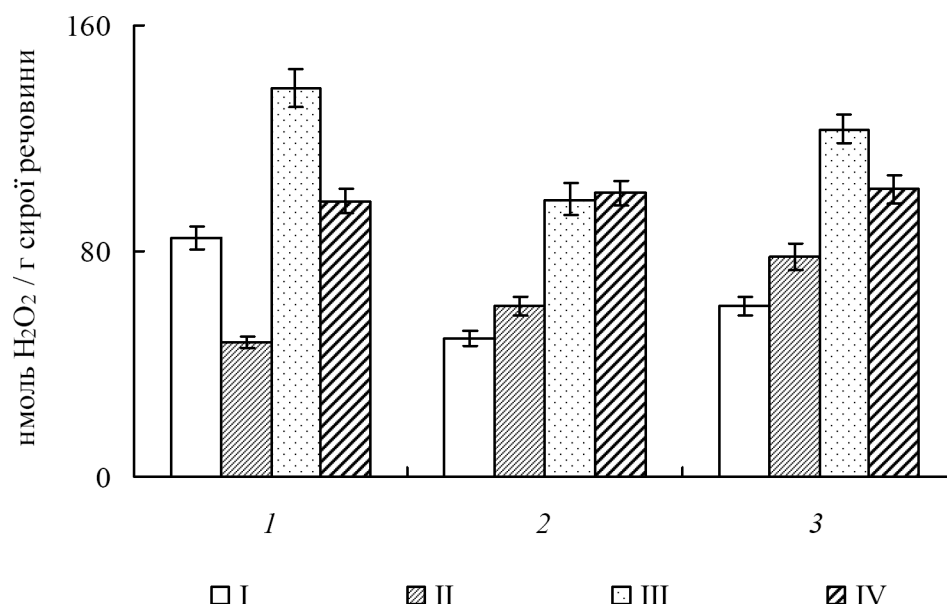


Рис. 1. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на вміст пероксиду водню в листках озимої пшениці різних сортів. Тут і на рис. 2—6:

1 — Астарта; 2 — Київська остиста; 3 — Малинівка; I — високий фон азоту; II — високий фон азоту + обробка карбамідом; III — низький фон азоту; IV — низький фон азоту + обробка карбамідом

вміст пероксиду в листках підвищувався за достатнього живлення азотом і відповідно незначно зростав і знижувався за нестачі азоту в ґрунті (див. рис. 1).

Зменшення вмісту пероксиду водню в листках за обробки рослин озимої пшениці сорту Астарта, яким конститутивно властивий підвищений вміст цієї активної форми кисню, карбамідом може свідчити про зниження рівня окиснювальних процесів у рослинах в результаті запуску захисних антиоксидантних систем, у тому числі й антиоксидантних ферментів. Збільшення вмісту пероксиду в листках оброблених карбамідом рослин пшениці сортів Київська остиста і Малинівка за оптимального забезпечення азотом, на нашу думку, можна вважати стресовою реакцією метаболізму рослин на обробку. Доведено, що пероксид водню відіграє роль вторинного месенджера у схемах передачі сигналів, що включають системи захисту рослин від стресу, зокрема індукцію синтезу ферментів-антиоксидантів [3, 4].

Активні форми кисню (АФК) виявляють високу агресивність і пошкоджують мембрани та інші клітинні компоненти. Цьому протидіє мобілізація різних захисних систем, що знижують інтенсивність утворення АФК та посилюють їх нейтралізацію. Для цього в клітині індукується синтез *de novo* антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, АПО, ГТР) та (або) активуються їх до того неактивні форми чи накопичуються низькомолекулярні антиоксиданти (аскорбат, глутатіон, токофероли, флавоноїди) [3, 4].

Ми встановили, що недостатнє азотне живлення в ґрунті призводить до підвищення активності антиоксидантних ферментів у листках озимої пшениці. При цьому особливо інтенсивно активуються СОД у листках рослин сорту Астарта та АПО і ГТР у рослин сортів Київська остиста, Малинівка (рис. 2—4).

Відомо, що супероксидні аніон-радикали O_2^- , які утворюються під час роботи електронтранспортних ланцюгів фотосинтезу і дихання, ней-

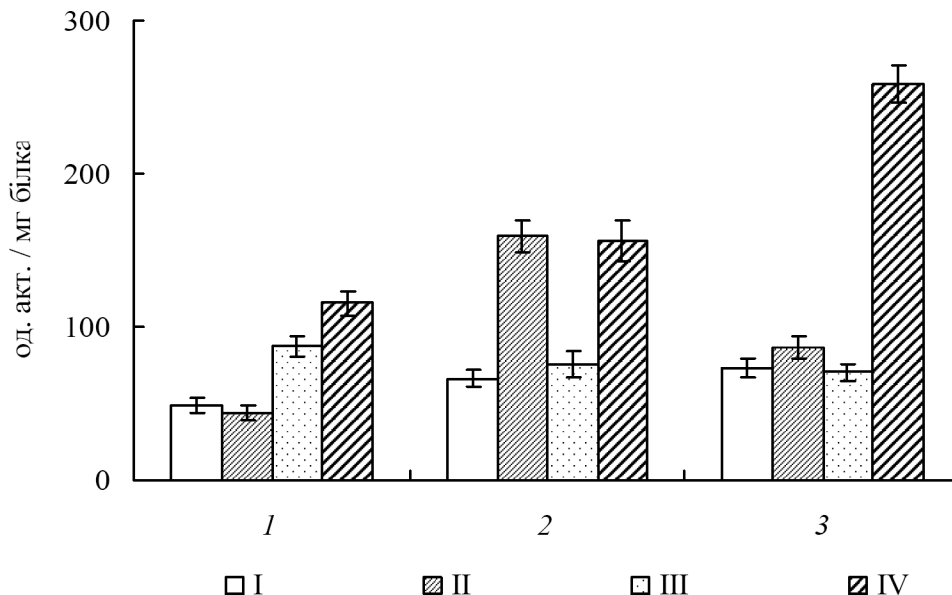


Рис. 2. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на активність супероксиддисмутази в листках озимої пшениці різних сортів

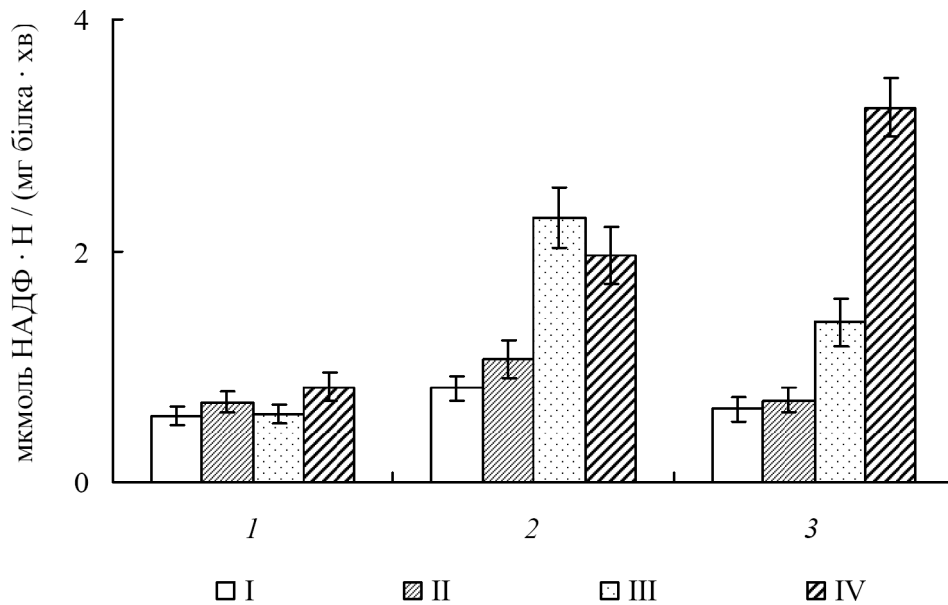


Рис. 3. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на активність глутатіонредуктази в листках озимої пшениці різних сортів

тралізуються за участі СОД з утворенням пероксиду водню. До ліквідації пероксиду залучений комплекс ферментів: каталаза, родина пероксидаз, а також ферменти аскорбат-глутатіонового циклу — АПО і ГТР [4]. Ми виявили, що у більшості випадків зростання активності СОД у листках супроводжувалось підвищенням активності АПО і ГТР як за оптимального живлення, так і за нестачі азоту в ґрунті, що очевидно пов'язано з ефективною роботою ферментів аскорбат-глутатіонового циклу в

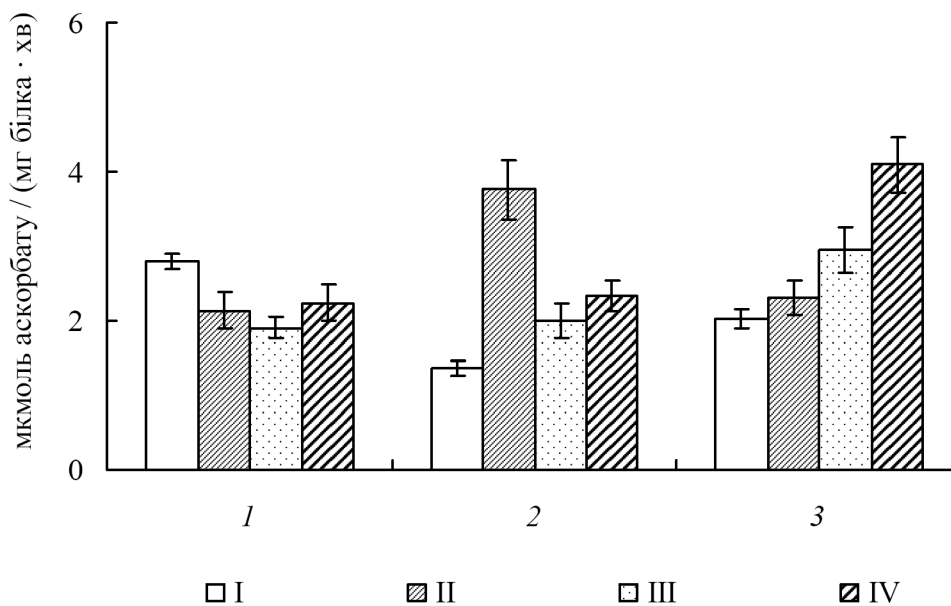


Рис. 4. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на активність аскорбатпероксидази в листках озимої пшениці різних сортів

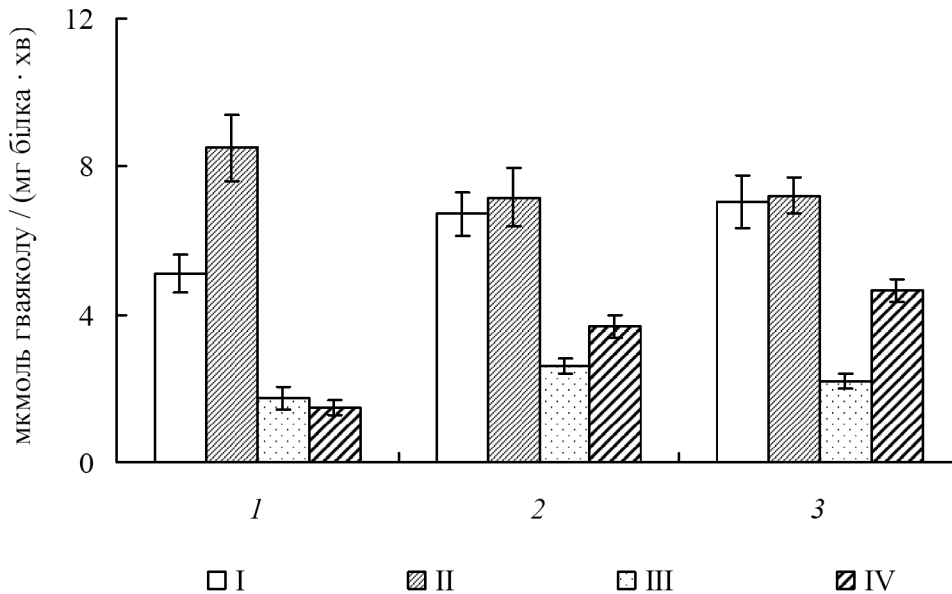


Рис. 5. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на активність гваяколпероксидази в листках озимої пшениці різних сортів

знешкодженні пероксиду водню, який утворюється в результаті реакції дисмутації супероксидних аніон-радикалів.

Обробка рослин карбамідом за низького фону азотного живлення індукувала підвищення активності СОД, АПО і ГТР у листках сортів озимої пшениці порівняно з необробленими рослинами. Особливим виявився сорт Малинівка, в якого зафіксовано найвищу активність усіх зазначених ферментів. За обробки рослин карбамідом на фоні оптимального забезпечення рослин азотом у ґрунті робота антиоксидантних ферментів порівняно з необробленими рослинами інтенсифікувалась незначно. За таких умов вирощування вирізнявся сорт Київська остиста, в якого активності СОД, АПО і ГТР були найвищими.

Ми встановили, що за низького рівня азоту в ґрунті активність ГПО у листках рослин усіх сортів озимої пшениці істотно знижувалась (рис. 5). Обробка рослин карбамідом індукувала підвищення активності цього ферменту як у рослин, що зростали за низького фону азотного живлення, так і за оптимального рівня азоту в ґрунті. Найвищий рівень активності ГПО в листках оброблених карбамідом рослин зафіксовано у сорту Малинівка за низького фону азоту в ґрунті та у сорту Астарта за оптимального фону азотного живлення.

Відомо, що ГПО бере участь у метаболізмі фенольних сполук і біосинтезі лігніну, тому її активування могло бути результатом як запуску антиоксидантного захисту, так і неспецифічної реакції на стрес, спричинений потраплянням на листок хімічної речовини — ксенобіотика і пов'язаної зі зміцненням клітинних стінок та зменшенням їх проникності [4].

Отже, згідно з отриманими нами результатами, за обробки рослин карбамідом активність антиоксидантних ферментів підвищується незалежно від рівня живлення рослин. На нашу думку, позакоренева обробка озимої пшениці карбамідом у використаній нами концентрації окрім

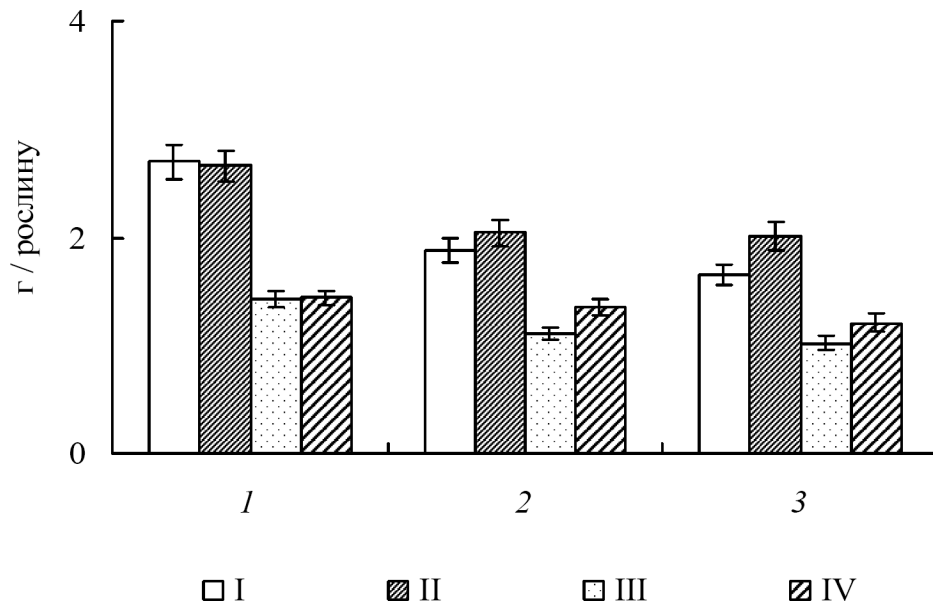


Рис. 6. Вплив позакореневого підживлення карбамідом на масу зерна озимої пшениці різних сортів

азотного підживлення чинила певний стресовий вплив на рослини, який стимулював розвиток захисних реакцій.

Облік зернової продуктивності озимої пшениці встановлено, що маса зерна з рослини озимої пшениці сорту Астарта значно вища, ніж двох інших сортів за обох рівнів азотного живлення. Позакоренева обробка озимої пшениці сорту Астарта карбамідом істотно не змінювала масу зерна з рослини за її вирощування як за високого, так і низького фонів азотного живлення (рис. 6). За обробки озимої пшениці сортів Київська остиста і Малинівка карбамідом маса зерна з рослини зростала як за високого, так і низького фонів азотного живлення. Це означає, що обробка рослин карбамідом сприяла розвитку адаптивних реакцій і поліпшенню реалізації їх генетичного потенціалу.

Таким чином, недостатнє забезпечення озимої пшениці азотом у ґрунті індукує розвиток стресопротекторних реакцій в рослинах, про що свідчить підвищення рівня пероксиду водню та активності антиоксидантних ферментів у листках. Позакоренева обробка озимої пшениці карбамідом окрім азотного живлення, з одного боку, є своєрідним стресом для рослин, з іншого — чинником, що запускає захисні механізми, зокрема активує роботу антиоксидантних ферментів, що сприяє ліпшій реалізації генетичного потенціалу продуктивності сортів озимої пшениці високобілкового спрямування.

1. Герман М.М. Вплив мінеральних добрив і допосівної обробки насіння на формування фізичних властивостей тіста та хлібопекарські показники якості зерна пшениці м'якої озимої // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. — 2012. — № 1. — С. 99—102.
1. Гриник І. Оптиміальне поєднання попередників і рівнів живлення під озиму пшеницю в умовах Полісся // Пропозиція. — 2001. — № 11. — С. 42—44.
2. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Обозный А.И. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2011. — 1 (22). — С. 6—34.

3. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллавердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. — 2012. — 59, № 2. — С. 163—178.
4. Ляшенко В.В., Маренич М.М. Вплив строків сівби на продуктивність посівів пшениці озимої // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. — 2010. — № 2. — С. 46—50.
5. Мельник А.Ф., Мартынов А.Ф. Формирование урожайности и качество зерна озимой пшеницы // Вестн. Орел. гос. аграр. ун-та. — 2012. — № 2 (35). — С. 23.
6. Моргул В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — 42, № 5. — С. 371—393.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
8. Egley G.H., Paul R.N., Vaughn K.C., Duke S.O. Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. // Planta. — 1983. — 157, N 1. — P. 224—232.
9. Hamer R., Van Vliet T. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. Special Publication — Royal Society of Chemistry Sci. — 1999. — 29. — P. 125—131.
10. Hruskov M., Svec I. Wheat hardness in relation to other quality factors // Czech. J. Food Sci. — 2009. — 27, N 4. — P. 240—248.
11. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase. 1. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. — 1977. — 59, N 2. — P. 309—314.
12. Li M., Yang X.W., Tian X.H. et al. Effect of nitrogen fertilizer and foliar zinc application at different growth stages on zinc translocation and utilization efficiency in winter wheat // Cereal Res. Communic. — 2014. — 42, N 1. — P. 81—90.
13. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. — 1981. — 22, N 5. — P. 867—880.
14. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. — 1976. — 57, N 2. — P. 308—309.
15. Sanchez-Garcia M., Alvaro F., Peremarti A. et al. Changes in bread-making quality attributes of bread wheat varieties cultivated in Spain during the 20th century // Eur. J. Agr. — 2015. — 63. — P. 79—88.
16. Sedlar O., Balik J., Cerny J. et al. Nitrogen uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) depending on fertilizer application // Cereal Res. Communic. — 2015. — 43, N 3. — P. 515—524.
17. Yannarelli G.G., Fernandez-Alvarez A.J., Santa-Cruz D.M. et al. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress // Phytochemistry. — 2007. — 68. — P. 505—512.

Отримано 01.02.2017

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЛИСТЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Т.П. Маменко, И.М. Шегеда, В.М. Починок, Л.В. Сенина

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В результате выполненных исследований установлено, что недостаточное обеспечение озимой пшеницы азотом в почве индуцирует развитие стрессопротекторных реакций в растениях, о чем свидетельствует повышение уровня пероксида водорода и активности антиоксидантных ферментов в листьях. Внекорневая обработка озимой пшеницы карбамидом кроме азотного питания обсуждается, с одной стороны, как своеобразный стресс для растений, с другой — как фактор, стимулирующий запуск защитных механизмов, в частности и активацию работы антиоксидантных ферментов. Это способствует лучшей реализации генетического потенциала продуктивности сортов озимой пшеницы высокобелкового направления.

EFFECTS OF NITROGEN SUPPLY ON ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN LEAVES OF WINTER WHEAT

T.P. Mamenko, I.M. Shegeda, V.M. Pochinok, L.V. Senina

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

It was found that insufficient supply of winter wheat by soil nitrogen caused defense reactions in plants, as evidenced by the increase of hydrogen peroxide content and the activity of antioxidant enzymes in leaves. Foliar dressing of winter wheat with urea is regarded as a kind of stress for the plant, on the one hand, and on the other, as a factor that stimulates protective mechanisms and activation of antioxidant enzymes. This contributes to a better realization of the genetic potential of winter wheat varieties with high protein content.

Key words: *Triticum aestivum* L., superoxide dismutase, glutathione reductase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, hydrogen peroxide, urea, nitrogen.