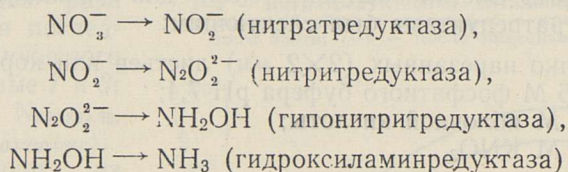


Ю. КАУП, Я. ЛИЙВ, ВАЛВЕ РООСАЛУ

### ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ И АДАПТИВНЫЙ ХАРАКТЕР НИТРАТРЕДУКТАЗЫ НЕКОТОРЫХ ТРАВ

Нитраты, поступающие в ткани растений, подвергаются процессам восстановления до аммиака, происходящим через нитрит, гипонитрит и гидроксилламин (Chibnall, 1939; Прянишников, 1945; Бах, 1950).

Исследования ферментов, катализирующих восстановление нитратов, подтвердили правильность гипотезы, согласно которой на каждом этапе восстановления нитраты катализируются соответствующим ферментом:



(Nicholas, 1959). Несмотря на то, что указанная схема, по всей вероятности, не исчерпывает все возможные пути восстановления нитратов до аммиака (Ратнер, Акимочкина, 1962), участие нитратредуктазы (восстановленный НАД: нитрат-оксидоредуктаза 1.66.1) в качестве катализатора в первой ступени восстановительного процесса убедительно доказано (Evans, Nason, 1953; Candella и др., 1957; Fujio Egami, 1957; Spencer, 1959; Afridi, Hewitt, 1964 и др.).

Ряд исследований (Pei-sung Tang, Hsiang-yü Wu, 1957; Пейве, Жизневская, 1961; Ваг-Акива, Sternbaum, 1965; Ingle и др., 1966) дал основание считать нитратредуктазу адаптативным ферментом.

Из данных литературы следует, что в процессе ассимиляции нитратного азота растениями первая стадия этого процесса — восстановление нитрата до нитрита — является лимитирующей для всего восстановительного процесса (Wallace, Pate, 1967), на это указывает и тот факт, что в аэробных условиях только нитраты могут накапливаться в растениях, а другие промежуточные азотистые соединения накапливаются в очень небольших количествах (Hageman, Fleisher, 1960; Ingle и др., 1966).

В литературе сравнительно мало данных о влиянии уровня азотного питания на активность и адаптивные свойства нитратредуктазы высших растений, в частности многолетних трав.

Постепенное расширение применения в растениеводстве, в частности в производстве кормов, высоких и сверхвысоких доз азотного удобрения



требует всестороннего изучения процессов ассимиляции азотистых веществ. Цель данной работы — изучить зависимость динамики и адаптивных свойств нитратредуктазы некоторых злаковых трав от уровня азотного питания.

### Методика исследования

Опыты проводились на тимopheевке (*Phleum pratense*), еже сборной (*Dactylis glomerata*) и райграсе пастбищном (*Lolium perenne*). Опыты были заложены на участке со слабоподзолистой почвой в совхозе «Саку» Харьковского района ЭССР.

Схема опытов включает пять вариантов для каждого вида трав: 1) PKN<sub>0</sub>, 2) PKN<sub>120</sub> (40+40+40), 3) PKN<sub>240</sub> (80+80+80), 4) PKN<sub>480</sub> (160+160+160), 5) PKN<sub>720</sub> (240+240+240). РК фон для каждого варианта был одинаковым и составлял соответственно P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 120 кг/га и K<sub>2</sub>O — 180 кг/га. При этом в качестве источника фосфора использовался суперфосфат, а в качестве источника калия — хлористый калий, которые разбрасывались поверхностно и однократно непосредственно перед вегетацией. Источником азота служил азотнокислый аммоний. Азотное удобрение вносилось в почву после очередной уборки биомассы трижды по одной трети общего количества. Биомасса убиралась три раза (3/VI 1968, 26/VI 1968 и 26/VII 1968). Для определения активности нитратредуктазы пробы отбирались восемь раз на разных стадиях вегетации подопытных растений.

Активность нитратредуктазы определялась методом Е. Мульдера (Mulder и др., 1959). Реакция восстановления нитратов проводилась в трубках Тунберга. Состав опытной смеси для каждого определения активности нитратредуктазы был следующим:

- 1) 0,5 г мелко нарезанных (2×2 мм) листьев или корней;
- 2) 5 мл 0,06 М фосфатного буфера рН 7,4;
- 3) 1 мл 0,1 М яблочной кислоты;
- 4) 1 мл 0,1 М KNO<sub>3</sub>.

Эта смесь инкубировалась при 36°C в течение полутора часов, после чего деятельность фермента прекращалась добавлением 1 мл 10%-ной уксусной кислоты. Пробы растирались в ступке и для осаждения белков добавлялось 2 мл насыщенного раствора (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а также небольшое количество активированного угля в порошке. Затем вся опытная смесь фильтровалась и в фильтрате определялось содержание нитрита методом, описанным в литературе (Nicholas, Nason, 1957). Активность нитратредуктазы выражалась в наномолях (нмоль) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> за полтора часа на 1 г сырого растительного материала. Общий азот в растительном материале определялся методом Кьельдаля, а нитрат — описанным в литературе методом (Woolley, Hicks, 1960).

Для вычисления содержания белкового азота аминный и амидный азоты определялись методами, описанными Г. Глаголевой (1962) и Н. Ястрембовичем и Ф. Калининим (1962) соответственно.

В качестве проб для определения активности нитратредуктазы брались листья, срезанные с 10—20 растений. Проведенные исследования показали, что при хранении растительного материала в полиэтиленовых мешках в холодильнике, через 5—10 ч наблюдалось небольшое снижение нитратредуктазной активности.

Данные литературы (Mulder и др., 1959; Hagemann и др., 1962 и др.) показывают, что определение нитратредуктазной активности методом Е. Мульдера связано с некоторой ошибкой, возникшей в связи с химическим превращением образовавшегося нитрита. Чтобы установить эту ошибку, в наших опытах была проведена инфильтрация нитрита.



Для этого 1 г растительного материала после инфильтрации раствором  $\text{NaNO}_2$  (содержание  $\text{NaNO}_2$  800  $\mu\text{моль}$ ) инкубировался в течение полутора часов, после чего определялось оставшееся количество нитрита. Как следует из этих данных, введенное количество инфильтрацией нитрита существенно уменьшается (30—50%). Следовательно, метод Е. Мульдера для определения нитратредуктазной активности можно использовать только в сравнительных исследованиях.

### Результаты исследования

Данные исследования динамики и адаптивного характера нитратредуктазы представлены на рис. 1—3. Активность нитратредуктазы пастбищного райграса, ежи сборной и тимофеевки определялась восемь раз. При этом три раза после внесения  $\frac{1}{3}$  общего азотного удобрения (кривые 1—3;  $\text{N}_0$ ,  $\text{N}_{40}$ ,  $\text{N}_{80}$ ,  $\text{N}_{160}$ ,  $\text{N}_{240}$ ). Три раза после внесения следующей трети общего азота (кривые 4—6;  $\text{N}_0$ ,  $\text{N}_{40+40}$ ,  $\text{N}_{80+80}$ ,  $\text{N}_{160+160}$ ,  $\text{N}_{240+240}$ ) и два раза после внесения последней дозы азотнокислого аммония (кривые 7 и 8;  $\text{N}_0$ ,  $\text{N}_{40+40+40}$ ,  $\text{N}_{80+80+80}$ ,  $\text{N}_{160+160+160}$ ,  $\text{N}_{240+240+240}$ ).

Как следует из представленных данных, ткани листьев тимофеевки, пастбищного райграса и особенно ежи сборной характеризовались относительно высокой нитратредуктазной активностью. При этом четко выражена положительная корреляция между нитратредуктазной активностью и уровнем азотного питания.

Прямо пропорциональная зависимость нитратредуктазной активности от уровня азотного питания хорошо наблюдается при применении до  $\frac{2}{3}$  общего фона азотного удобрения. После внесения всего указанного

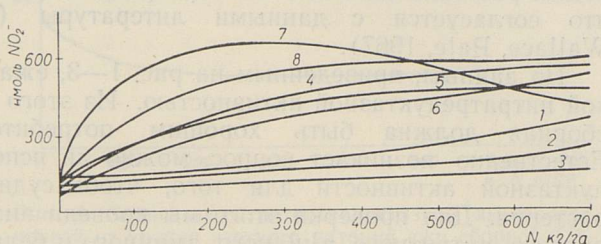


Рис. 1. Зависимость нитратредуктазной активности от уровня азотного питания райграса пастбищного. 1—3 — нитратредуктазная активность после внесения в почву  $\frac{1}{3}$  общего азота; 4—6 — после внесения  $\frac{2}{3}$  общего азота; 7—8 — после внесения  $\frac{3}{3}$  общего азота.

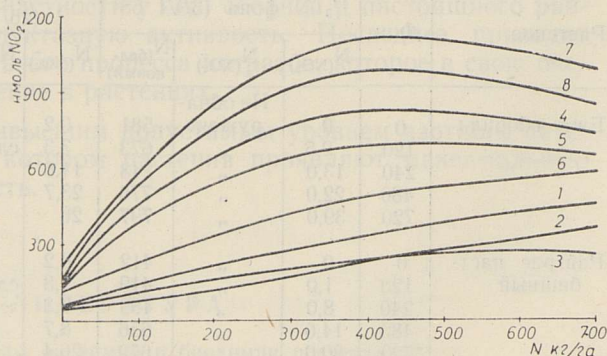


Рис. 2. Зависимость нитратредуктазной активности от уровня азотного питания ежи сборной. Обозначения кривых см. рис. 1.

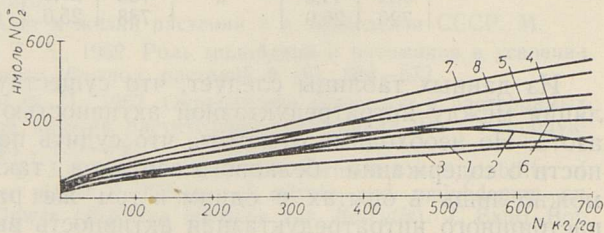


Рис. 3. Зависимость нитратредуктазной активности от уровня азотного питания тимофеевки. Обозначения кривых см. рис. 1.



количества азотного фона в случае райграса пастбищного и ежи сборной (рис. 1—3; кривые 7 и 8) активности нитратредуктазы проходят через максимум. Максимальная нитратредуктазная активность проявляется у райграса (650  $\mu\text{моль NO}_2^-$ ) и у ежи сборной (1100  $\mu\text{моль NO}_2^-$ ). Очевидно, сверхвысокие дозы азотного удобрения в данном случае ( $N_{720}$ ) подавляют активность фермента. Возможно, что здесь в какой-то мере влияет накопление образовавшегося нитрата. С другой стороны, при использовании метода Е. Мульдера для определения нитратредуктазной активности лимитирующим фактором может быть также недостаточная обеспеченность коферментом (НАД(Ф)) или его восстановленной формой (Yukio Yamamoto, 1963).

Изучение динамики активности нитратредуктазы показало, что у молодых растений активность нитратредуктазы выше, чем у более старых, что согласуется с данными литературы (Пейве, Жизневская, 1961; Wallace, Pate, 1967).

По данным, приведенным на рис. 1—3, ежа сборная отличается высокой нитратредуктазной активностью. Из этого как бы вытекает, что ежа сборная должна быть хорошим потребителем нитратного азота. Естественно возникает вопрос, можно ли использовать меру нитратредуктазной активности для того, чтобы судить о белковом содержании растения. Для проверки этого мы провели анализы на содержание нитратного, нитритного, амидного, аминного и белкового азота в подопытных растениях. Полученные результаты представлены в таблице.

Содержание нитратного, нитритного и белкового азота в растениях в миллиграммах на 100 г сырого материала

Растение	Фон	$\frac{1}{3}$ N фона (3/VI 63)			$\frac{2}{3}$ N фона (26/VI 68)			$\frac{3}{3}$ N фона (26/VII 63)		
		$N(\text{NO}_3^-)$	$N(\text{NO}_2^-)$	$N_{\text{бел-ковый}}$	$N(\text{NO}_3^-)$	$N(\text{NO}_2^-)$	$N_{\text{бел-ковый}}$	$N(\text{NO}_3^-)$	$N(\text{NO}_2^-)$	$N_{\text{бел-ковый}}$
Ежа сборная	0	0	Не обнаружено	581	0,2	0	607	0	0	737
	120	2,5	„	673	3,3	следы	583	26,0	0,2	916
	240	13,0	„	743	11,6	0,3	675	46,5	0,1	619
	480	22,0	„	776	23,7	0,2	756	44,0	0,2	903
	720	39,0	„	797	26	1,2	767	57,0	0,2	898
Райграс пастбищный	0	0	„	412	0,2	0	476	0	0	531
	120	1,0	„	419	7,8	следы	526	28,5	0,1	695
	240	3,0	„	489	9,3	0,4	526	32,5	0,1	590
	480	14,0	„	656	8,7	0,6	540	60,0	0,1	734
	720	30,0	„	672	26,4	0,3	554	62,0	0,1	737
Тимофеевка	0	0	„	523	1,0	0	586	1,0	0	494
	120	1,6	„	682	7,3	следы	620	15,0	0,2	723
	240	12,0	„	680	8,0	0,1	648	38,0	0,1	734
	480	14,0	„	768	27,0	0,9	719	48,0	0,2	804
	720	26,0	„	788	25,0	0,6	781	55,0	0,2	592

Из данных таблицы следует, что существует положительная корреляция между нитратредуктазной активностью и содержанием белкового азота. Но необходимо отметить, что судить по нитратредуктазной активности о содержании белкового азота, а также нитрата в растениях можно лишь в опытах с одним и тем же растением. Так, у райграса пастбищного нитратредуктазная активность выше, чем у тимофеевки, но содержание белкового азота несколько ниже.

Как правило, с увеличением уровня азотного питания содержание нитратного азота в листьях повышается, достигая 0,06%. При использовании



высокого уровня азотного питания наблюдается и заметное увеличение содержания нитритного азота.

Как известно (Wallace, Pate, 1967), при корневом питании небобовых нитраты восстанавливаются в основном в листьях растений. В таком случае нитратредуктазная активность корней должна быть очень низка или вовсе отсутствовать. Была определена нитратредуктазная активность корней пастбищного райграса, тимфеевки и ежи сборной после внесения всего отмеченного количества азотного удобрения. Полученные результаты приведены на рис. 4. Как и предполагалось, нитратредуктазная активность ткани корней очень низка и не превышает  $40 \text{ нмоль NO}_2^-$  в течение полутора часов на  $1 \text{ г}$  сырого материала.

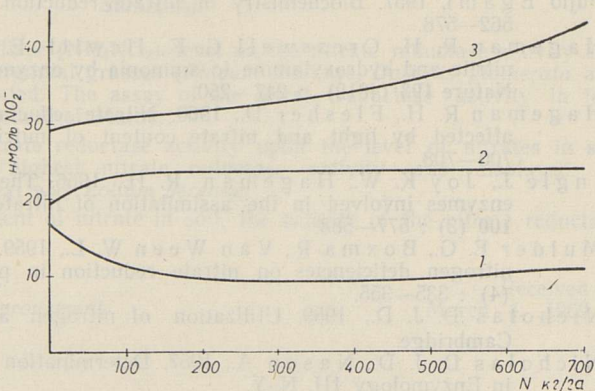


Рис. 4. Зависимость нитратредуктазной активности корней от уровня азотного питания ежи сборной (1), райграса пастбищного (2) и тимфеевки (3).

Как следует из приведенного выше экспериментального материала, нитратредуктаза исследованных злаковых трав обладает адаптивными свойствами до определенного уровня азотного питания. Сверхвысокие дозы азотного удобрения, в частности у ежи сборной и пастбищного райграса, подавляют нитратредуктазную активность. Последнее приводит к замедлению восстановительного процесса нитратов, которое в свою очередь увеличивает их накопление в растениях.

По всей вероятности, наивысшим допустимым уровнем азотного питания является уровень, при котором растения проявляют максимальную нитратредуктазную активность.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бах А. Н., 1950. Избранные труды по химии и биохимии растений. М.
- Глаголева Г. А., 1962. Микрометод определения аминного азота. В сб.: Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М. : 66—70.
- Шейве Я. В., Жизневская Г. Я., 1961. Микроэлементы и урожай. Тр. Ин-та биологии АН ЛатССР : 257—276.
- Прянишников Д. Н., 1945. Азот в жизни растений и в земледелии СССР. М.
- Ратнер Е. И., Акимочкина Г. А., 1962. Роль молибдена и витаминов в усвоении растениями нитратного азота. Физиол. растений **9** (6) : 663—672.
- Ястрембович Н. И., Калинин Ф. Л., 1962. Определение углеводов и растворимых соединений азота в одной навеске растительного материала. Рост и продуктивность растений, вып. 23 : 119—130.
- Afridi M. M. R. K., Hewitt E. J., 1964. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. I. Effects of nitrate and molybdenum on enzyme activity, in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*). J. Exptl Bot. **15** : 251—260.
- Bar-Akiva A., Sternbaum J., 1965. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure of the nitrogen requirement of citrus trees. Plant and Cell Physiol. **6** (3) : 575—577.



- Candela M. I., Fisher E. G., Hewitt E. J., 1957. Molybdenum as a plant nutrient. X. Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plant grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand cultures. *Plant Physiol.* **32** : 280—287.
- Chibnall A., 1939. Protein metabolism in the plant. New-Halen.
- Evans H. J., Nason A., 1953. Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.* **28** : 233.
- Fujio Egami, 1957. Biochemistry of nitrate reduction. *Svensk kem. tidskr.* **69** (12) : 562—578.
- Hageman R. H., Cresswell C. F., Hewitt E. J., 1962. Reduction of nitrate, nitrite and hydroxylamine to ammonia by enzymes extracted from higher plants. *Nature* **193** (4812) : 247—250.
- Hageman R. H., Flesher D., 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* **35** : 700—708.
- Ingle J., Joy K. W., Hageman R. H., 1966. The regulation of activity of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* **100** (3) : 577—588.
- Mulder E. G., Boxma R., Van Ween W. L., 1959. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues. *Plant and Soil* **10** (4) : 335—355.
- Nicholas D. J. D., 1959. Utilization of nitrogen and its compounds by plants. Cambridge.
- Nicholas D. J. D., Nason A., 1957. Determination of nitrate and nitrite. *Methods in Enzymology* III. N.-Y.
- Pei-sung Tang, Hsiang-yü Wu, 1957. Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature* **179** (4574) : 1355—1356.
- Spencer D., 1959. A DPNA — specific nitrate reductase from germinating wheat. *Aust. J. Biol. Sci.* **12** (2) : 181—195.
- Wallace W., Pate J. S., 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the Cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum*, Wallr.). *Ann. Bot.* **31** (122) : 213—226.
- Woolley J. T., Hicks G. P., 1960. Rapid determination nitrate and nitrite in plant material. *J. Agric. and Food Chem.* (Nov./Dec.) : 481—490.
- Yukio Yamamoto, 1963. Pyridine nucleotide content in the higher plant. Effect of age of tissue. *Plant Physiol.* **38** (1) : 45—49.

Эстонский научно-исследовательский институт земледелия и мелиорации

Поступила в редакцию  
4/III 1969

## I. KAUP, J. LIIV, VALVE ROOSALU

### LÄMMASTIKVÄETISE HULGA MÖJU MÖNEDE ROHTTAIMEDE NITRAAT-REDUKTAASI AKTIIVSUSELE JA ADAPTIIVSUSELE

#### Resüme

Uurit ammoniumnitraadi erinevate foonide mõju keraheina (*Dactylis glomerata*), karjamaa raiheina (*Lolium perenne*) ja timuti (*Phleum pratense*) nitraatreduktaasi aktiivsusele ja adaptiivsusele. Lämmastikväetisi kasutati fosfor- ja kaaliväetiste foonil järgmiselt (kg/ha): N<sub>0</sub>; N<sub>120</sub> (40+40+40); N<sub>240</sub> (80+80+80); N<sub>480</sub> (160+160+160); N<sub>720</sub> (240+240+240), kusjuures lämmastikväetisi, nagu näeme, anti vegetatsiooniperioodi jooksul kolm korda pealtväetisena ühe kolmandiku kaupa üldkogusest peale järjekordset biomassi koristamist (kolm koristust).

Leiti, et uuritud taimede nitraatreduktaas on adaptiivsete omadustega. Väga kõrgetel N-foonidel täheldati juba nitraatreduktaasi aktiivsuse langust. Kõige kõrgem nitraatreduktaasi aktiivsus on keraheinal, millele järgnevad karjamaa raihein ja timut. Valguisalduse ja nitraatreduktaasi aktiivsuse vahel on olemas positiivne korrelatsioon.

Eesti Maaviljeluse ja Maaparanduse Teadusliku Uurimise Instituut

Saabus toimetusse  
4. III 1969



J. KAUP, J. LIIV, VALVE ROOSALU

THE EFFECT OF NITROGEN FERTILIZER LEVEL ON THE NITRATE REDUCTASE ACTIVITY AND ADAPTATIVE NATURE IN CASE OF PERENNIAL GRASSES

Summary

The effect of nitrogen fertilizer (NH4NO3) level on the nitrate reductase activity and adaptative nature in case of perennial grasses (Phleum pratense, Dactylis glomerata and Lolium perenne) was investigated. The assay of the nitrate reductase activity in leaf fragments was based on the method of Mulder.

The dependence of the nitrate reductase activity upon the level of nitrates in soil has been demonstrated. The highest nitrate reductase activity was displayed by Dactylis glomerata, and the next was Lolium perenne.

In the case of a high content of nitrate in soil, the activity of the nitrate reductase decreased.

Estonian Research Institute of Agriculture and Land Improvement

Received March 4, 1969