

Майму ТОХВЕР, Антс ТОХВЕР

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА В ПРОРОСТКАХ И ЛИСТЬЯХ НИЗКО- И ВЫСОКОБЕЛКОВЫХ СОРТОВ И МУТАНТОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

Решение проблемы продовольственного белка требует наряду с выведением продуктивных сортов пшеницы уделения должного внимания повышению содержания и качества белка в зерне. Повышение урожая и содержания белка можно достигнуть улучшением агротехники и внесением в почву повышенных доз азотных удобрений (Чмелева, Медведева, 1973; Павлов, Минеев, 1974; Имшенецкий, Сысоев, 1976; Прийлинн и др., 1976). При этом одни сорта пшеницы способны накапливать больше, другие — меньше азота (Климашевский, 1972). Поэтому большое внимание в отношении накопления белка должно быть уделено генотипам, способным извлекать из почвы больше азота и накапливать больше белка в зерне. Создание таких генотипов является возможным (Созинов, 1979). Генетические предпосылки, определяющие уровень накопления белка в зерне, проявляются через ряд физиолого-биохимических процессов, протекающих в вегетирующем растении.

Уже в 1969 году В. А. Джонсон (Johnson и др., 1969) указал на необходимость выработки биохимических критериев выделения генотипов с высоким содержанием белка в зерне. Одним из возможных подходов к решению этого вопроса является сравнение активности ферментов, участвующих в освоении азота, так как ферменты являются прямыми продуктами действия гена. Уровень их активности определяет метаболический потенциал генотипа. Азот поглощается растениями пшеницы в основном в виде нитрата, который затем восстанавливается до аммонийной формы при помощи ряда ферментов, из которых первую позицию занимает нитратредуктаза (НР) (Beever, Hageman, 1969; Eilrich, Hageman, 1973; Dalling, Halloran, Wilson, 1975). При этом установлено, что азотный метаболизм в целом контролируется первым звеном в этой цепи превращений. Более высокая НР-активность позволяет усилить поглощение азота и синтез белка, но только при наличии достаточного количества азота в почве (Croy, Hageman, 1970). И действительно, между сортами пшеницы, кукурузы, ячменя и других культур обнаружены значительные различия в НР-активности, коррелирующие с урожайностью, содержанием белка и отзывчивостью этих сортов на удобрения (Duffield, Croy, Smith, 1972; Имшенецкий, Сысоев, 1976; Сысоев, Имшенецкий, 1976; Rao и др., 1977; Воронова, Реймерс, Хавкин, 1978). Это создает предпосылку для употребления в селекции активности НР как биохимического критерия белковости зерна уже до получения урожая (Johnson, Whittington, Blackwood, 1976). Указанные идеи в планируемой селекционной программе до сих пор остались на уровне теоретических разработок, но их применение на практике могло бы способствовать развитию высокоэффективной селекционной техники.

Целью нашей работы являлось выяснить изменчивость НР-активности в проростках и листьях яровой пшеницы в процессе вегетации высоко- и низкобелковых сортов и полученных от них мутантах, а также проследить динамику накопления азота в листьях.

Материал и методика

Объектами исследования служили сорта яровой пшеницы 'Норрена', 'Ленинградка', 'Манитоу' и мутанты, полученные воздействием N-нитрозо-N-метил- и N-нитрозо-N-этилмочевины от сорта 'Норрена'. Из них мутанты Т-13 и Т-36 представляли низко-, а К-46 и Т-203 высокобелковые формы. НР-активность определяли у первых листьев 7-суточных проростков, выращенных в песке на растворе Кюпа в термостатированной камере при 20°C и освещенности 32 Вт/м². Источниками освещения служили люминесцентные лампы ЛДЦ-30.

В полевых опытах для анализа брали флаговый и второй сверху листья, учитывая, что они вносят наибольший вклад в суммарную НР-активность растения (Филиппова, Токарев, Солоненко, 1977). Листья для определения НР-активности срезали утром в 9 ч в солнечные дни и выдерживали на льду до начала анализов (примерно 0,5 ч).

НР-активность определяли *in vivo* по методике, описанной Б. И. Токаревым (1977) в следующие фазы развития: на 41-й день после посева (фаза кущения), 61-й день после посева (колошение), 69-й день после посева (цветение), 29-й день после опыления (молочная спелость зерна).

Листья разрезали на кусочки по 3 мм, и навески по 200 мг помещали в пенициллиновые бутылочки с 5 мл инкубационного буфера, содержащего в 1 л 0,03 моля двузамещенного фосфата натрия, 0,1 моля нитрата калия, 0,5 мл Тритона X-100 и 50 мг хлорамфеникола (рН буфера 7,7). Дeterгент использовали для понижения поверхностного натяжения, чтобы обеспечить более полное заполнение жидкостью межклетников и исключить всплывание кусочков ткани на поверхность, а также повысить проницаемость клеточных мембран для органических ионов. Хлорамфеникол исключает возможность бактериального загрязнения ткани и буфера.

Флаконы на специальном штативе ставили на лед в вакуумный эксикатор. Воздух из эксикатора откачивали до разряжения 0,5 мм рт. ст., а затем медленно впускали обратно. Эту процедуру повторяли дважды. После этого бутылочки с инфильтрованной тканью ставили в водяной термостат при 30° в темноту. По окончании инкубирования флаконы помещали на тающий лед и сразу отбирали пробы для определения выделенного нитрита. Для этого в пробы добавляли 2,0 мл 20%-ной уксусной кислоты, 0,4 мл 0,6%-ной сульфаниловой кислоты в 20%-ной соляной кислоте, 0,4 мл 2М ацетата натрия и 3 мл воды. Через 30 мин окраску колориметрировали на ФЭК-56М (максимум пропускания при 546 нм).

Для изучения передвижения азота из верхних листьев в зерно брали флаговый лист в период появления третьего листа, изучали изменение веса, сухой вес и содержание азота. Пробы брали рано утром в дни определения НР-активности.

Результаты представляют собой средние трех независимых опытов, в каждом опыте было 6 повторностей.

Содержание общего азота определяли биамперометрическим титрованием иона аммония после озоления материала в смеси серной и хлорной кислот (Цап, Леончик, 1968).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что содержание азота в верхних листьях растений пшеницы снижается по мере их старения (табл. 1). Это связано с оттоком его в зерно для формирования урожая. Количество общего азота снижалось от фазы колошения до фазы восковой спелости зерна в 2—4 раза. Самое высокое содержание азота в листьях наблюдалось в фазе кущения, потом держалось примерно на одном уровне до колошения и во время цветения стало понижаться.

Таблица 1

Динамика содержания азота (% на абс. сухое вещество)
в верхних листьях растений яровой пшеницы (1979 г.)

Сорт, мутант	Кущение 12/VI	Колошение 3/VII	Цветение 14/VII	Молочная спелость 3/VIII	Восковая спелость 13/VIII	Спелое зерно
Т-13	3,88	3,14	2,67	1,86	1,01	2,18
Т-36	3,22	3,94	3,54	2,55	1,20	2,58
'Ленинградка'	3,24	3,78	3,13	3,02	1,29	2,87
Т-203	3,71	3,28	3,89	1,74	1,94	3,16
'Манитоу'	4,83	4,36	3,38	1,66	0,92	3,24
'Норрена'	4,39	4,28	3,62	2,30	1,73	3,26
К-46	4,44	4,54	4,11	1,75	1,84	3,93

Минимальная достоверная разница между образцами при $P \leq 0,05$

	0,43	0,39	0,61	0,41	0,36	0,32
--	------	------	------	------	------	------

На фоне описанной общей закономерности ясно видно, что растения высокобелковых форм по сравнению с низкобелковыми содержат большую концентрацию азота в листьях уже на ранних стадиях развития (на уровне значимости $P \leq 0,05$). В фазах образования колоса и формирования урожая это различие уменьшается. Как видно из табл. 1, в ряде случаев низкий уровень азота в листьях последней фазы развития наблюдается у форм с повышенным содержанием азота в зерне ('Манитоу', Т-203). У этих форм во время образования зерна транспорт азота из листьев в зерно происходит явно эффективнее, чем у других. В некоторых случаях у высокобелковых форм (К-46) уровень азота в листьях находился на довольно высоком уровне в течение всего периода вегетации. Это, вероятно, обусловлено как активным транспортом азота в зерно, так и большей способностью усвоения его (НР-активность находится также на высоком уровне, см. табл. 2).

По-видимому, динамическое равновесие между образованием азотсодержащих веществ, в первую очередь белков в листьях, с одной стороны, и оттоком азота в колос, с другой, зависит также от генотипа.

Корреляционный анализ показал, что содержание азота в листьях в начальной фазе кущения коррелирует отрицательно с массой 1000 зерен (коэффициент корреляции $r = -0,56$) и положительно с содержанием азота в спелом зерне ($r = +0,57$). Во время колошения и цветения последняя корреляция еще выше ($+0,74$ и $+0,84$ соответственно). При старении растений корреляция явно слабеет, по-видимому, в результате различий в интенсивности процесса мобилизации.

НР-активность в проростках и растениях высокобелковых форм пшеницы была выше, чем в низкобелковых (табл. 2). При этом нужно отметить, что четкая достоверная разница в НР-активности между низко- и высокобелковыми формами имеет место в фазах проростков, колошения и молочной спелости, в других фазах она не наблюдается.

Характеристика сортов и мутантов яровой пшеницы по активности НР (1979 г.)

Сорт, мутант	Содержание белка в спелом зерне, %	Масса 1000 зерен, г	Активность НР (в мкг на 1 г сырого вещества за 0,5 ч)				
			7-дневные проростки	кущение	колошение	цветение	молочная спелость зерна
T-13	12,4	44,1	107	339	236	211	150
T-36	14,7	39,2	95	349	222	238	119
'Ленинградка'	16,4	43,4	118	308	242	301	137
T-203	18,0	30,3	128	361	312	299	135
'Манитоу'	18,5	34,1	150	387	321	328	149
'Норрена'	18,6	34,2	143	366	282	320	163
K-46	22,4	21,6	154	354	333	241	173

Минимальная достоверная разница между образцами при $P \leq 0,05$

31 85 71 67 50

Достоверная положительная корреляция между НР-активностью и содержанием белка в спелом зерне проявлялась у 7-суточных проростков ($r = +0,875$) в фазах колошения ($r = +0,862$) и молочной спелости зерна ($r = +0,618$). Аналогичные результаты получены у кукурузы (Сысоев, Имшенецкий, 1976).

Между массой 1000 зерен и НР-активностью наблюдалась отрицательная корреляция начиная с фазы 7-дневных проростков.

Из вышеизложенного видно, что низко- и высокобелковые образцы различались между собой как по НР-активности, так и по содержанию азота в листьях. При старении эти различия не были такими четкими.

Определение НР-активности первого листа легко выполнимо в лабораторных условиях круглогодично и в короткие сроки, и, по-видимому, может быть широко применено для предварительного выявления высокобелковых форм (сортов, мутантов, гибридов). То же относится к содержанию азота в листьях растений в начальных фазах развития, которые, вероятно, тоже можно использовать в качестве оценки белковости зерна.

Показано все же (Сгоу, Hageman, 1970), что генетический потенциал высокой активности НР еще не гарантия высокого содержания белка. Такие факторы, как снабжение нитратами, эффективность транспорта, полегаемость и восприимчивость к болезням, могут оказать влияние на аккумуляцию белка в зерно. В то же время кажется маловероятным, что генотипы с низкой НР-активностью имеют высокобелковое зерно, так как они не способны в достаточном количестве снабжать процессы транспорта восстановленным азотом. Предварительно полученную лабораторную оценку белковости нужно, конечно, проверить на перспективных образцах в полевых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

- Воронова Л. П., Реймерс Ф. Э., Хавкин Э. Е. Активность нитратредуктазы у линий и гибридов кукурузы. — Докл. АН СССР, 1978, 240, № 1, 203—206.
- Имшенецкий Е. И., Сысоев А. Ф. Влияние некоторых факторов на активность нитратредуктазы и содержание общего азота в проростках низко- и высокобелковых форм кукурузы. — Науч. тр. ВСГИ, 1976, вып. 13, 95—101.
- Климашевский Э. Л. Специфика генотипических реакций растений на удобрения. — Сиб. вестн. с.-х. науки, 1972, № 5, 7—15.
- Павлов А. Н., Минеев В. Г. Влияние азотных удобрений на количество зерна пшеницы. — Вестн. с.-х. науки, 1974, № 8, 61—66.

- Приллинь О. Я., Вяляютс А., Каск В., Тохвер М. Реакция мутантных линий и некоторых сортов яровой пшеницы на высокие дозы минеральных удобрений. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1976, 25, № 2, 118—131.
- Созинов А. А. Селекция пшеницы на качество зерна. — В кн.: Селекция и сортовая агротехника озимой пшеницы. М., 1979, 42—43.
- Сысоев А. Ф., Имшенецкий Е. И. Активность нитратредуктазы в проростках, и содержание белка в зерне кукурузы. — Науч.-техн. бюл. ВСГИ, 1976, вып. 26, 41—43.
- Токарев Б. И. Методы определения величины нитратредуктазной активности у пшеницы и ячменя. — В сб.: Эффективность химизации сельского хозяйства в Сибири. Новосибирск, 1977, 58—65.
- Филиппова Г. И., Токарев Б. И., Солоненко Л. П. Наследование величины нитратредуктазной активности у яровой пшеницы при межсортовой гибридизации. — Сиб. вестн. с.-х. науки, 1977, № 1, 39—41.
- Чмелева З. В., Медведева А. М. Влияние удобрений на накопление белка и лизина в сортах яровой пшеницы. — Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1973, 52, № 1, 242—248.
- Цап М. Л., Леончик О. А. Определение аммонийного азота в агрохимических объектах методом биамперометрического титрования без отгонки аммиака по Кьельдалю. — Агрехимия, 1968, № 11, 114—129.
- Beever, L., Hageman, R. H. Nitrate reduction in higher plants. — Annu. Rev. Plant Physiol., 1969, 20, 495—522.
- Croy, L. I., Hageman, R. H. Relationship of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. — Crop Sci., 1970, 10, N 3, 280—285.
- Dalling, M. J., Halloran, G. M., Wilson, J. H. The relation between nitrate reductase activity and grain nitrogen productivity in wheat. — Austral. J. Agr. Res., 1975, 26, 1—10.
- Duffield, R. D., Croy, L. I., Smith, E. L. Inheritance of nitrate reductase activity, grain protein, and straw protein in a hard red winter wheat cross. — Agron. J., 1972, 64, N 2, 249—251.
- Eitrich, G. L., Hageman, R. H. Nitrate reductase activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). — Crop Sci., 1973, 13, N 1, 59—66.
- Johnson, C. B., Whittington, W. J., Blackwood, G. C. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. — Nature, 1976, 226, N 5564, 133—134.
- Johnson, V. A., Mattern, P. J., Whited, D. A., Schmidt, J. W. Breeding for high protein content and quality in wheat. — In: New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein. Vienna, 1969, 29—40.
- Rao, K. P., Rains, D. W., Qualset, C. O., Huffaker, R. C. Nitrogen nutrition and grain protein in two spring wheat genotypes differing in nitrate reductase activity. — Crop Sci., 1977, 17, 283—286.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
1/XI 1984

Maimu TOHVER, Ants TOHVER

NITRAATREDUKTAASI AKTIIVSUS JA LÄMMASTIKUSISALDUS TERA KÕRGE JA MADALA VALGUSISALDUSEGA SUVINISU SORTIDE JA MUTANTIDE IDANDITES JA LEHTEDES

Töös on näidatud, et tera kõrge valgusisaldus on seotud kõrge lämmastikusisalduse ja nitraatreduktaasi aktiivsusega idandites ja lehtedes. Meetodit soovitatakse kasutada biokeemilise kriteeriumina tera kõrge valgusisalduse varaseks prognoosimiseks.

Maimu TOHVER, Ants TOHVER

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY AND NITROGEN CONTENT IN THE VARIETIES AND MUTANTS OF SPRING WHEAT WITH HIGH AND LOW GRAIN PROTEIN

The paper deals with the differences in the nitrate reductase activity and accumulation of nitrogen in the upper leaves of wheat plant. Nitrate reductase activity in leaves is connected with the grain protein content. The activity of this enzyme may be one of the indications of the early diagnosis of the low or high protein content in grain. The evaluation of diverse genotypes for nitrate reductase activity is only one of many similar kinds of assessments of "biochemical criteria" necessary for a plant breeder.