

УДК 581.131

УГЛЕКИСЛОТНЫЙ ГАЗООБМЕН НА СВЕТУ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ХЛОРОПЛАСТОВ ФЛАГОВЫХ ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Д.А. КИРИЗИЙ, О.Г. СОКОЛОВСКАЯ-СЕРГИЕНКО, О.О. СТАСИК

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: kiriziy@ukrpost.net*

На растениях озимой пшеницы трех сортов, выращенных в условиях вегетационного опыта на двух контрастных фонах минерального питания, в репродуктивный период развития определяли интенсивность фотосинтеза, фотодыхания, активность супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы хлоропластов флаговых листьев. Показано, что активность основных ферментов системы антиоксидантной защиты хлоропластов в расчете на массу сырого вещества тесно положительно коррелирует с интенсивностью углекислотного газообмена флаговых листьев растений пшеницы на свету в течение периода цветения—молочно-восковая спелость. При анализе данных по отдельным фазам развития (цветение, молочная, молочно-восковая спелость) выявлены положительные корреляционные зависимости между интенсивностью углекислотного газообмена на свету и активностью ферментов в расчете на массу сырого вещества и отрицательные — в расчете на хлорофилл.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., фотосинтез, фотодыхание, супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза.

Фотосинтетическая ассимиляция CO_2 лежит в основе продуктивности растительного организма и поэтому стабильность работы фотосинтетического аппарата как в течение онтогенеза, так и в переменных условиях окружающей среды во многом определяет урожайность сельскохозяйственных культур. Среди них пшеница занимает ведущее положение по своей пищевой ценности, экологической пластичности и потенциалу продуктивности. Именно с этой культурой связываются главные надежды в решении продовольственной проблемы, причем интенсификация работы ее ассимиляционного аппарата рассматривается как наиболее перспективный прием дальнейшего повышения урожайности [1]. Изучение особенностей фотосинтетической деятельности пшеницы, выявление физиологических механизмов и показателей, отражающих их функционирование, которые были улучшены в процессе селекции и связаны с повышением продуктивности, а также оценка возможностей их дальнейшей оптимизации являются как никогда актуальными.

Одной из проблем стабилизации работы фотосинтетического аппарата для максимальной реализации генетического потенциала продуктивности является его защита от активных форм кислорода (АФК) [10]. Процесс преобразования энергии квантов света в энергию химических связей в хлоропластах даже в нормальных условиях сопровождается об-

разованием АФК вследствие того, что не все электроны, передающиеся по электронтранспортной цепи (ЭТЦ) от реакционных центров фотосистем, участвуют в образовании восстановительных эквивалентов (НАДФ · Н₂). Часть из них передается на кислород и дает начало цепочке образования различных типов АФК. Этот процесс усиливается с повышением восстановленности стромального пула НАДФ. Вдобавок у С₃-растений, к которым относится и пшеница, ассимиляция СО₂ на свету сопровождается фотодыханием вследствие наличия у РБФК/О кроме карбоксилазной еще и оксигеназной функции [3]. В процессе фотодыхания также образуются АФК, в частности Н₂О₂. Однако, фотодыхание повышает энергоемкость фотосинтеза, увеличивая использование восстановительных эквивалентов, поэтому его значение как продуцента АФК в общем редокс-гомеостазе остается дискуссионным [18]. В любом случае избыток АФК необходимо элиминировать, чтобы предотвратить их разрушительное действие на биологические макромолекулы и мембранные структуры.

При отклонении условий произрастания от оптимальных или резких изменениях напряженности факторов внешней среды, сопровождающихся возникновением стрессового состояния организма, образование АФК, как известно, возрастает в силу неспецифических реакций на клеточном уровне [14]. Процесс фотосинтеза в этих условиях также нарушается, в первую очередь вследствие рассогласования работы ЭТЦ и цикла Кальвина, что сопровождается образованием избыточного (по сравнению с нормальными условиями) количества АФК в самих хлоропластах. Вместе с тем повышение уровня АФК в клетке имеет ключевое значение в индукции сигнальных систем, управляющих процессами адаптации и онтогенетического развития, включая старение [16]. В такой ситуации первостепенное значение приобретает система антиоксидантной защиты хлоропластов, основными компонентами которой являются ферменты супероксиддисмутаза (СОД) и аскорбатпероксидаза (АПО), принимающие участие в регуляции уровня АФК [15].

Исходя из вышеизложенного должна существовать связь между интенсивностью углекислотного газообмена на свету и активностью антиоксидантных ферментов хлоропластов, однако ее характер в зависимости от периода онтогенеза, условий выращивания, сортовых особенностей растений пшеницы остается малоизученным.

Цель нашей работы состояла в изучении корреляционных связей интенсивности фотосинтеза и фотодыхания с активностями СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев растений озимой пшеницы различных сортов в период образования и налива зерновок при двух контрастных уровнях минерального питания. В данном случае минеральное питание было выбрано как один из основных факторов, определяющих формирование и функционирование фотосинтетического аппарата, что позволило расширить спектр варьирования изучаемых показателей газообмена.

Методика

Опыты проводили на растениях озимой мягкой пшеницы трех сортов — Фаворитка, Смуглянка и Мироновская 808, которые после перезимовки в естественных условиях пересадили весной в фазе кущения в вегетационные сосуды на 10 кг почвы (по 20 растений в сосуд). Для набивки сосудов брали серую оподзоленную почву, которую смешивали с песком в соотношении 3 : 1. Растения выращивали на двух фонах минерального

питания — высоким и низким. В первом случае в сосуды при набивке вносили нитроаммофоску в расчете $N_{80}P_{80}K_{80}$ мг/кг почвы. В фазу выхода в трубку растения в этих сосудах дополнительно подкормили нитроаммофоской так, что общее количество внесенных макроэлементов составило $N_{160}P_{160}K_{160}$ мг/кг почвы. В сосуды с низким фоном минерального питания при набивке вносили $N_{32}P_{32}K_{32}$ мг/кг почвы и дополнительно не подкармливали. Сосуды размещали на стеллаже вегетационной площадки при естественном освещении, влажность почвы поддерживали на уровне 60—70 % ПВ поливом сверху и в трубку. Опыт заложен в шестикратной повторности.

В фазы цветения, молочной, молочно-восковой спелости измеряли интенсивность углекислотного газообмена флаговых листьев растений на свету — фотосинтез и фотодыхание. Показатели газообмена регистрировали в контролируемых условиях на установке, смонтированной на базе оптико-акустического инфракрасного газоанализатора ГИАМ-5М, включенного по дифференциальной схеме. Неотделенные от растений листья размещали в термостатированной (+25 °С) камере и освещали лампой накаливания КГ-2000 через водяной фильтр для устранения избытка инфракрасной радиации в спектре ее излучения. Плотность светового потока на уровне листа составляла 400 Вт/м² ФАР. Через камеру продували атмосферный воздух со скоростью 1 л/мин. Интенсивность видимого фотосинтеза регистрировали по достижении стационарного уровня через 40—50 мин после размещения листа в камере. Интенсивность фотодыхания оценивали по величине выброса CO₂ в первые 60 с после выключения света. Показатели газообмена рассчитывали согласно стандартным методикам [4].

Параллельно измерениям газообмена отбирали пробы для определения активности антиоксидантных ферментов хлоропластов флаговых листьев. Хлоропласты выделяли механическим способом при температуре 0—4 °С. Среднюю навеску (2 г) листьев гомогенизировали в семикратном объеме буферного раствора такого состава: 0,33 М сорбитол, 5 мМ MgCl₂, 0,1 % БСА, 4 мМ аскорбиновая кислота (АК) и 50 мМ *трис*-НСl (рН 7,5). Гомогенат фильтровали через 2 слоя капроновой ткани и центрифугировали на центрифуге К-24D при 80 g и температуре 0—4 °С на протяжении 5 мин для осаждения тяжелых частиц. Надосадочную жидкость сливали в другие предварительно охлажденные центрифужные пробирки и центрифугировали при 2000 g 10 мин для получения фракции хлоропластов. Осадок хлоропластов ресуспендировали в изотонической среде с 4 мМ аскорбиновой кислоты, 50 мМ *трис*-НСl (рН 7,5) объемом 2 мл и в дальнейшем использовали для определения активности супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы.

Активность СОД определяли спектрофотометрически с помощью нитротетразолиевого синего при длине волны 560 нм [11]. Активность АПО измеряли в ультрафиолетовой области спектра при 290 нм по методу Чена и Асады [7]. Содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов определяли по методу Арнона [5].

Биохимические анализы проводили в трехкратной повторности, измерение интенсивности фотосинтеза — в четырехкратной. Экспериментальные данные обрабатывали статистически с помощью программы Excel. Для корреляционных связей указаны величины достоверности аппроксимации (R²).

Результаты и обсуждение

Полученные экспериментальные данные приведены в таблице. Гросс-фотосинтез рассчитывали как сумму видимого фотосинтеза и фотодыхания. Поскольку этот показатель более адекватно отражает истинную скорость ассимиляции CO_2 на уровне хлоропластов, его использовали в дальнейшем для поиска взаимосвязей между интенсивностью фотосинтеза и активностью антиоксидантных ферментов. В результате примененной нами схемы опытов с растениями разных сортов, на разных фонах минерального питания и в разные фазы вегетации получен достаточно широкий спектр варьирования показателей углекислотного газообмена и активности антиоксидантных ферментов, что позволило построить корреляционные зависимости между ними и оценить тесноту связей.

Между активностями СОД и АПО хлоропластов для всего массива полученных данных выявлена тесная связь как в расчете активности на массу сырого вещества листовой пластинки, так и на содержание хлорофилла (рис. 1). Такой эффект объясняется сопряженностью работы этих ферментов, а именно: СОД превращает супероксидный анион-радикал (образующийся в результате переноса электронов на кислород в ФС I) в

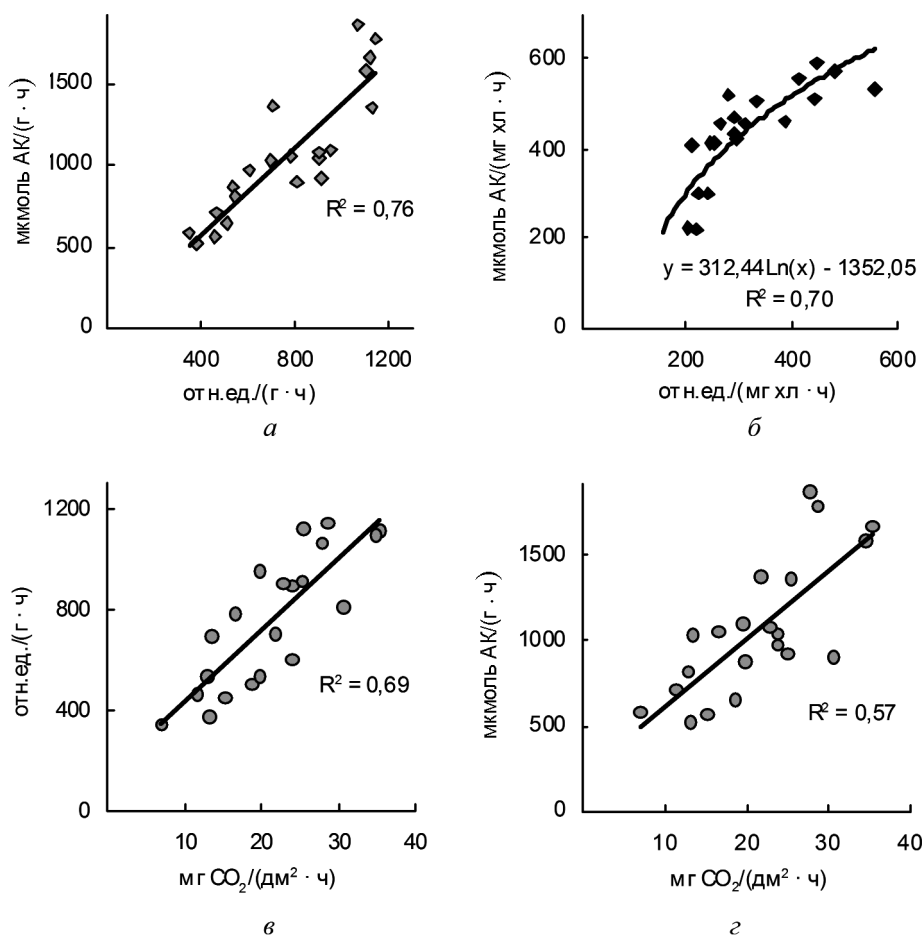


Рис. 1. Связь между активностями СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев озимой пшеницы в расчете на массу сырого вещества (а), хлорофилла (б), между интенсивностью фотосинтеза и активностью СОД (в), АПО (г)

пероксид водорода, который в свою очередь детоксифицируется АПО до воды.

В расчете на массу сырого вещества связь между активностями СОД и АПО в исследованном диапазоне была прямолинейной, а в расчете на содержание хлорофилла аппроксимировалась логарифмическим уравнением с тенденцией к более резкому снижению активности АПО при низких значениях активности СОД. Характерно, что эта часть результатов получена главным образом для стареющих листьев, в фазу молочно-восковой спелости. Можно предположить, что в этот период необходимо повышение уровня АФК и особенно H_2O_2 , который, по данным исследований [8, 12], участвует в индукции регулируемой деградации хлоропластов и запуске процессов ремобилизации элементов питания.

Вообще в расчете на сырое вещество активность антиоксидантных ферментов в листьях растений на низком фоне минерального питания была меньше, чем на высоком во все сроки измерения (таблица). В расчете на хлорофилл — наоборот: на низком фоне активность была больше, чем на высоком. Нужно подчеркнуть, что расчет активности ферментов на содержание хлорофилла точнее отражает особенности их функционирования именно на хлоропластном уровне. Очевидно при недостатке элементов минерального питания нарушается сопряженность функционирования в хлоропластах ЭТЦ и цикла Кальвина. В частности, недостаток азота и фосфора может способствовать возникновению дисбаланса между энергогенерирующими и потребляющими процессами, особенно в переменных световых и температурных условиях окружающей среды, в которых находились исследуемые растения (фактически, в вегетационном опыте контролировались лишь условия минерального питания и водообеспеченность растений). Это приводит к перевосстановлению компонентов ЭТЦ, что сопровождается передачей электронов на кислород, образованием супероксидных анион-радикалов и других АФК, а следовательно, и соответствующим повышением активности ферментов антиоксидантной защиты.

Таким образом, недостаток элементов минерального питания является для растения стрессовым фактором и (или) уменьшает его устойчивость к действию других неблагоприятных факторов окружающей среды, что приводит к интенсификации функционирования антиоксидантной системы хлоропластов.

Вместе с тем у растений, которые развивались при недостатке элементов минерального питания, удельное количество фотосинтетических структур (хлоропластов) в массе листовой ткани было значительно меньше по сравнению с высоким фоном, причем падение содержания хлорофилла произошло в большей степени, чем повышение активности антиоксидантных ферментов в хлоропластах, что и отразилось в снижении их активности в расчете на единицу массы листа (см. таблицу).

Аналогичные результаты были получены китайскими исследователями на флаговых листьях пшеницы: в расчете на массу сырого вещества активность антиоксидантных ферментов увеличивалась с повышением уровня обеспечения растений азотом [6]. При этом были выявлены генотипические различия в реакции фотосинтетического аппарата растений на уровень минерального питания, однако активность ферментов определялась во всей листовой ткани, а не в хлоропластах, что снижает возможность интерпретации полученных данных для понимания механизмов антиоксидантной защиты собственно фотосинтетического аппарата.

Динамика интенсивности углекислотного газообмена флаговых листьев и активности антиоксидантных ферментов хлоропластов у разных сортов озимой пшеницы при высоком (в) и низком (н) уровне минерального питания

Сорт, вариант	Видимый фотосинтез	Гросс-фотосинтез	Фото-дыхание	Содержание суммы хлорофиллов, мг/г	СОД, отн.ед./г · ч	АПО, мкмоль АК/г · ч	СОД, отн.ед./мг хл · ч	АПО, мкмоль АК/мг хл · ч
	мг СО ₂ /(дм ² · ч)				СОД, отн.ед./г · ч	АПО, мкмоль АК/г · ч	СОД, отн.ед./мг хл · ч	АПО, мкмоль АК/мг хл · ч
Цветение								
Смутлянка (в)	23,5	28,6	5,1	3,43	1145,1	1779	277,6	518,5
Смутлянка (н)	16,6	19,7	3,1	2,05	952,2	1098	558,6	535,7
Мироновская 808 (в)	20,8	25,4	4,6	2,92	1123,6	1356	384,8	464,3
Мироновская 808 (н)	11,5	13,4	1,9	1,74	699,5	1029	449,0	591,4
Фаворитка (в)	30,5	35,3	4,8	3,61	1119,1	1659	310,1	459,6
Фаворитка (н)	21,4	23,9	2,5	2,03	901,1	1039	443,9	511,7
НСР _{0,05}	1,9	2,0	0,4	0,25	92,3	112	33,1	47,6
Молочная спелость								
Смутлянка (в)	23,6	27,7	4,1	4,05	1064,7	1863	262,9	459,9
Смутлянка (н)	14,1	16,7	2,6	1,89	782,5	1054	414,0	557,5
Мироновская 808 (в)	18,8	21,9	3,1	3,34	703,4	1366	210,6	409,2
Мироновская 808 (н)	9,2	11,6	2,4	1,39	463,7	706	333,6	507,6
Фаворитка (в)	30,9	34,7	3,8	3,76	1102,4	1583	293,2	421,1
Фаворитка (н)	20,4	22,9	2,5	1,88	903,2	1078	480,4	573,5
НСР _{0,05}	1,8	1,9	0,3	0,22	81,7	105	32,5	45,4
Молочно-восковая спелость								
Смутлянка (в)	21,6	25,1	3,5	4,17	915,3	915	219,5	219,3
Смутлянка (н)	13,0	15,3	2,3	1,87	453,1	565	242,3	301,9

Мироновская 808 (в)	16,4	18,7	2,3	3,19	507,2	650	202,0	224,0
Мироновская 808 (н)	5,5	7,0	1,5	1,40	341,3	581	243,8	415,0
Фаворитка (в)	27,6	30,7	3,1	4,00	813,2	900	203,3	224,9
Фаворитка (н)	11,8	13,2	1,4	1,71	377,4	516	220,7	301,8
НСР _{0,05}	1,6	1,7	0,3	0,23	58,6	72	22,1	36,5

Так, в исследованиях на шпинате показано, что в расчете на площадь или массу сухого вещества листа активность антиоксидантных ферментов была значительно ниже у растений при недостатке азота по сравнению с нормально обеспеченными [13]. Вместе с тем при расчете на хлорофилл различий между вариантами питания не было, а при расчете на белок активность антиоксидантных ферментов была выше у лимитированных по азоту растений. Отсутствие различий при расчете на хлорофилл в данном случае объясняется опять-таки определением активности антиоксидантных ферментов в массе листовой ткани, а не в хлоропластах. При этом сами авторы подчеркивают большой вклад в антиоксидантную активность листа митохондриальной СОД.

В молодых листьях шелковицы также выявлено повышение интенсивности пероксидного окисления липидов, активности СОД, АПО, глутатионредуктазы в расчете на белок у растений, выращенных при недостатке основных макроэлементов [17]. Аналогичные результаты получены на листьях молодых (20-суточных) растений пшеницы, где активности СОД и АПО в расчете на белок при недостатке азотного питания были гораздо выше, чем при нормальном обеспечении минеральным азотом. В то же время активность глутатионредуктазы, пероксидазы и каталазы существенно не различалась между вариантами опыта [2].

Исходя из того, что процесс фотосинтеза даже в нормальных условиях является источником АФК, а в стрессовых тем более, связь между интенсивностью фотосинтеза и активностями антиоксидантных ферментов является вполне ожидаемой, что и подтверждают выявленные нами для всего массива полученных данных линейные положительные корреляционные зависимости между интенсивностьюgross-фотосинтеза и активностями ферментов в расчете на массу сырого вещества (см. рис. 1). Поскольку интенсивность фотосинтеза рассчитывалась на единицу площади листа, ее значение (в контролируемых условиях) определялось количеством фотосинтетических структур (хлоропластов), размещенных на этой площади, которые были обеспечены соответствующим пулом антиоксидантных ферментов. Поэтому повышение интенсивности фотосинтеза соответствовало увеличению количества фотосинтетических единиц, а следовательно — и активности антиоксидантных ферментов (положительная зависимость). При неблагоприятных условиях (низкий уровень минерального питания) количество фотосинтетических структур на единицу площади уменьшалось, что сопровождалось снижением интенсивности фотосинтеза.

При расчете активностей ферментов на хлорофилл их корреляция с интенсивностью фотосинтеза

для всего массива полученных данных не выявлена. Это можно объяснить тем, что точки с низкими значениями фотосинтеза соответствуют растениям на низком фоне минерального питания, у которых активность антиоксидантных ферментов в расчете на хлорофилл повышалась (см. таблицу), что привело к нарушению зависимости между этим показателем и фотосинтезом. И вдобавок полученный массив данных охватывает довольно продолжительный период вегетации, на протяжении которого происходило постепенное старение листьев, что также сопровождалось уменьшением интенсивности фотосинтеза вследствие деградации фотосинтетических структур и усилением окислительных процессов даже в нормальных условиях минерального питания [6]. Это внесло существенный дополнительный вклад в нарушение обсуждаемой зависимости.

Поскольку варьирование показателей интенсивности фотосинтеза и активности антиоксидантных ферментов было обусловлено по крайней мере тремя факторами — уровнем минерального питания, онтогенетическими изменениями и генотипическими особенностями — мы проанализировали полученные массивы данных по каждому из них.

Оказалось, что для каждой из исследованных фаз развития можно построить отдельную зависимость между интенсивностью фотосинтеза и активностью ферментов как в расчете на массу сырого вещества, так и на хлорофилл (рис. 2). Для СОД уровень линии тренда постепенно снижался от фазы цветения к фазе молочно-восковой спелости. Для АПО линии трендов в фазы цветения и молочной спелости практически не различались, а в фазу молочно-восковой спелости она проходила существенно ниже. Очевидно, что более низкий уровень линии тренда в фазу молочно-восковой спелости обусловлен более сильным снижением активности антиоксидантной системы, чем интенсивности фотосинтеза в процессе старения листьев.

При построении корреляций по фазам развития для активностей ферментов в расчете на массу сырого вещества зависимость была положительной, при этом коэффициенты достоверности аппроксимации оказались выше, чем для зависимости, построенной для всего массива данных (см. рис. 1). Для активностей ферментов в расчете на хлорофилл выявлено, что в фазы цветения и молочно-восковой спелости корреляция с фотосинтезом была отрицательной, а в фазу молочной спелости практически отсутствовала (см. рис. 2). Примененная нами детализация по фазам развития зависимостей между интенсивностью фотосинтеза и активностью антиоксидантных ферментов точнее отвечает физиологическому состоянию растения в исследуемый период. Именно отрицательная корреляция между интенсивностью фотосинтеза и активностью антиоксидантных ферментов в расчете на хлорофилл по фазам развития свидетельствует в пользу высказанного выше предположения о стрессовом влиянии недостатка минерального питания на фотосинтетический аппарат растений, что сопровождается генерацией повышенного количества АФК и, соответственно, необходимостью усиления активности защитных систем. Экспериментальные точки с наименьшими значениями интенсивности фотосинтеза, но с наиболее высокими активностями ферментов были получены для каждой фазы в вариантах с низким фоном минерального питания. Расчет по фазам развития отделил дополнительное влияние фактора старения листовой ткани на связь между фотосинтезом и активностью антиоксидантных ферментов хлоропластов.

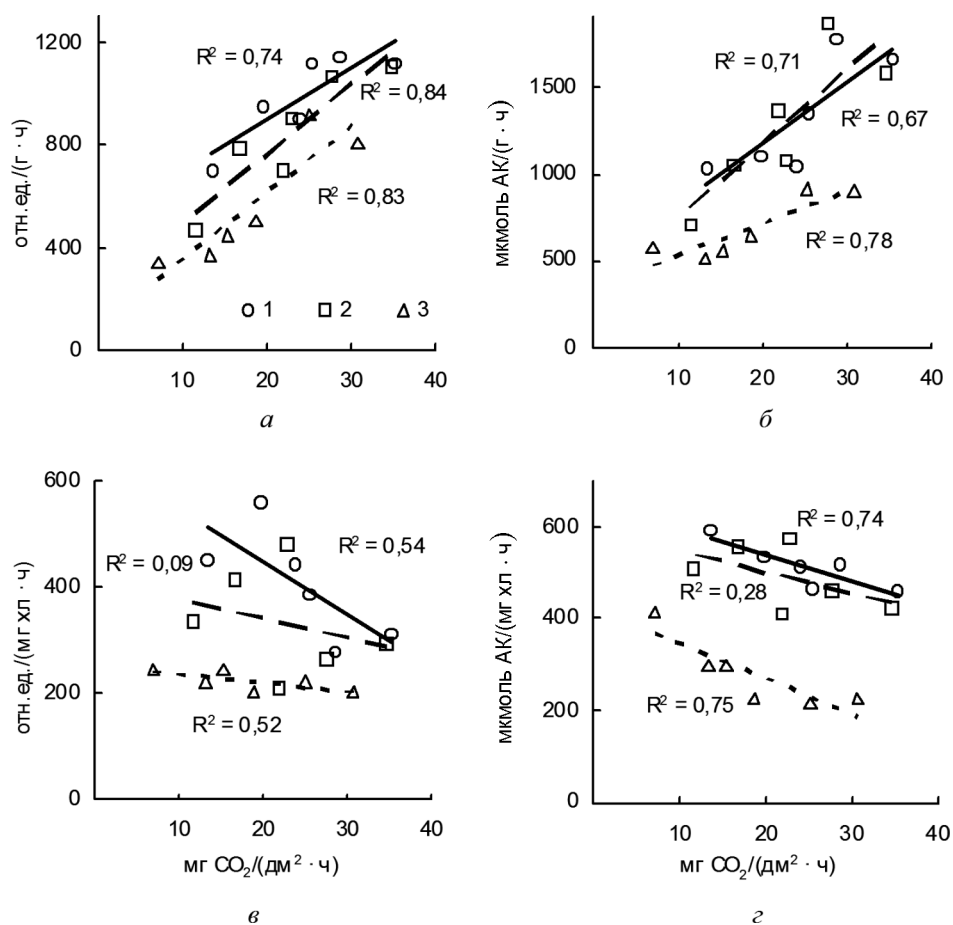


Рис. 2. Связь между интенсивностью фотосинтеза и активностью СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев озимой пшеницы в расчете на массу сырого вещества (соответственно а, б), хлорофилла (соответственно в, г) по фазам развития:

1 — цветение, 2 — молочная спелость, 3 — молочно-восковая спелость

При расчете на хлорофилл сильнее проявляется снижение линий регрессии для стареющих листьев, отражающее опережающее уменьшение активности антиоксидантных ферментов хлоропластов по сравнению с активностью ассимиляции CO₂. Это может быть обусловлено очередностью деградации белков в хлоропластах, т.е. компоненты собственно фотосинтетического аппарата хлоропластов разрушаются в процессе старения в последнюю очередь. Однако, более вероятно, что уменьшение активности антиоксидантных ферментов является генетически запрограммированным звеном сигнальной системы индукции старения фотосинтетического аппарата, связанной с необходимостью повышения содержания АФК в хлоропластах. Так, у растений арабидопсиса обнаружен специальный хлоропластный белок, играющий ключевую роль в индукции старения листьев и деградации хлоропластов, которая опосредуется повышением уровня H₂O₂ [8].

Между интенсивностью фотосинтеза и активностями антиоксидантных ферментов в расчете на массу сырого вещества для двух уровней минерального питания также найдены положительные корреляционные зависимости (рис. 3). Они предопределены уменьшением количества хлоропластов в листе при недостатке минерального питания.

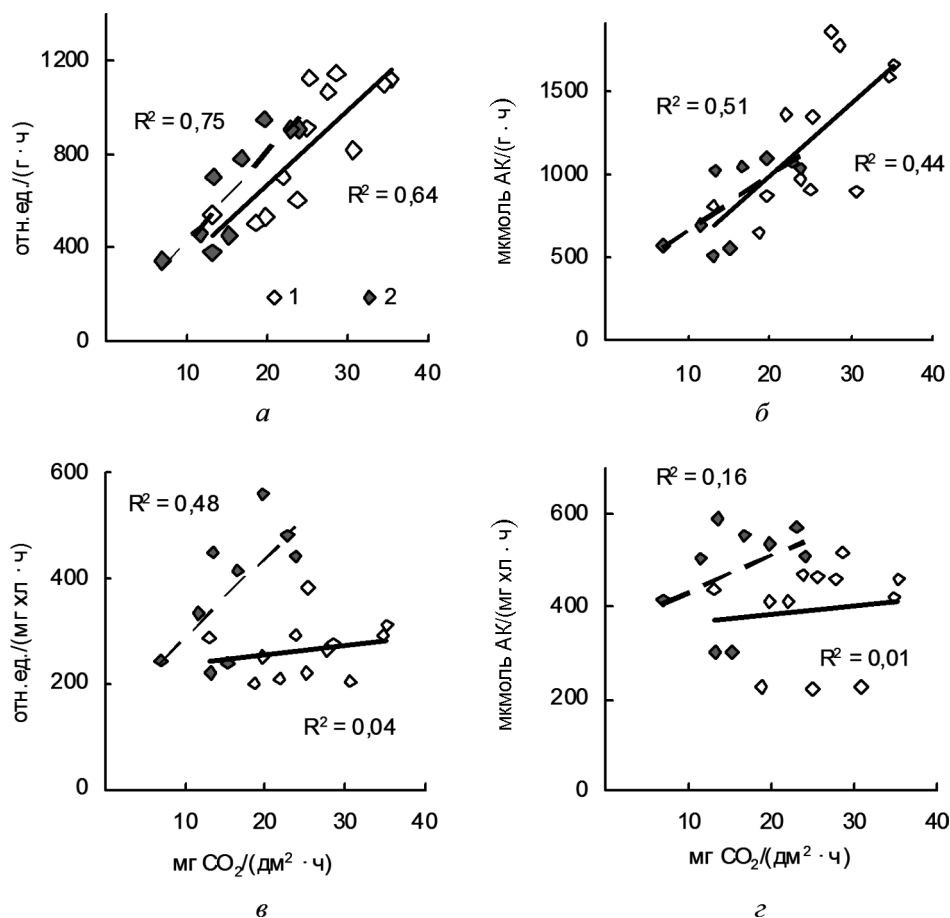


Рис. 3. Связь между интенсивностью фотосинтеза и активностью СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев озимой пшеницы в расчете на массу сырого вещества (соответственно а, б), хлорофилла (соответственно в, г) в зависимости от уровня минерального питания: 1 — высокий уровень, 2 — низкий уровень

И наоборот — с усилением минерального питания количество хлоропластов увеличивается, что сопровождается повышением интенсивности фотосинтеза. Вместе с тем линия тренда для активности СОД на низком уровне минерального питания имела тенденцию к превышению линии тренда на высоком уровне. Для активности АПО в расчете на массу сырого вещества тренды на высоком и низком уровнях минерального питания практически не различались.

В расчете на хлорофилл значения активности СОД на низком уровне минерального питания существенно превышали таковые на высоком уровне, при этом наблюдалась положительная корреляция между активностью СОД на низком уровне и интенсивностью фотосинтеза (см. рис. 3). Аналогичную тенденцию можно отметить и для АПО, но корреляция была менее тесной. На высоком уровне минерального питания не выявлена корреляция между активностями антиоксидантных ферментов в расчете на хлорофилл и интенсивностью фотосинтеза. В последнем случае справедливо то же объяснение, что и для общего массива данных — линии трендов зависимостей между интенсивностью фотосинтеза и активностью ферментов существенно различались в разные фазы развития растений. В стрессовых условиях низкого уровня мине-

рального питания активность антиоксидантных ферментов при одинаковой интенсивности фотосинтеза в фазу цветения больше, чем на высоком (это хорошо видно, если провести условную линию, параллельную оси ординат). Однако недостаток элементов питания ускоряет старение листьев, деградацию их белковых структур, ремобилизацию азотсодержащих соединений, что приводит к быстрому снижению активности как антиоксидантных, так и фотосинтетических ферментов. Это придает линии тренда угол наклона и предопределяет положительную корреляцию между интенсивностью фотосинтеза и активностями СОД и АПО для вариантов с низким уровнем минерального питания. Кроме того, как видно из таблицы, самые высокие значения обоих показателей были характерны для современных высокопродуктивных сортов Фаворитка и Смуглянка, а самые низкие — для сорта старой селекции Мионовская 808. Можно предположить, что большая активность антиоксидантных ферментов в листьях высокопродуктивных сортов в условиях недостатка питания способствовала высокой активности фотосинтетического аппарата и её поддержанию в течение онтогенеза.

Поиск зависимостей между интенсивностью фотосинтеза и активностями антиоксидантных ферментов для отдельных сортов не выявил существенных различий. В данном случае вариабельность показателей в массиве данных определялась фазой развития и уровнем питания, которые, как отмечено выше, имеют разный характер зависимостей.

Для фотодыхания, как и для фотосинтеза, нами выявлена довольно тесная корреляционная связь между интенсивностью этого процесса и активностью СОД и АПО в расчете на массу сырого вещества листа, что является вполне ожидаемым, поскольку интенсивность фотодыхания определяется главным образом оксигеназной активностью РБФК/О, соотношение которой с карбоксилазной активностью не изменяется в онтогенезе, при разном уровне питания и довольно консервативно для C_3 -растений.

При анализе полученного массива данных по отдельным составляющим — фаза развития, минеральное питание, сортовые особенности — характер прохождения линий тренда связей интенсивности фотодыхания и активностей антиоксидантных ферментов хлоропластов был подобным таковому для интенсивности фотосинтеза, однако коэффициенты корреляции в большинстве случаев были выше. Это по-видимому связано с двойственной ролью фотодыхания. С одной стороны, фотодыхание является непосредственным мощным источником образования H_2O_2 в пероксисомах, и, хотя убедительных доказательств выхода пероксида из пероксисом не обнаружено, показано, что варьирование интенсивности гликолатного метаболизма существенно изменяет антиоксидантно-прооксидантный баланс в клетке [9]. С другой стороны, получены многочисленные экспериментальные данные, подтверждающие важное протекторное значение фотодыхания в стрессовых условиях, сопровождающихся накоплением АФК [3]. Фотодыхание, увеличивая энергозатраты ассимиляции CO_2 , определенным образом предотвращает перевосстановленность компонентов ЭТЦ и перенос электронов на кислород. Кроме того, обнаружено, что даже умеренное ослабление антиоксидантной системы хлоропластов, вызванное разными причинами, активизирует фотодыхание или отдельные компоненты гликолатного метаболизма [18].

Линии трендов по фазам развития для связей между интенсивностью фотодыхания и активностями ферментов, рассчитанных на массу

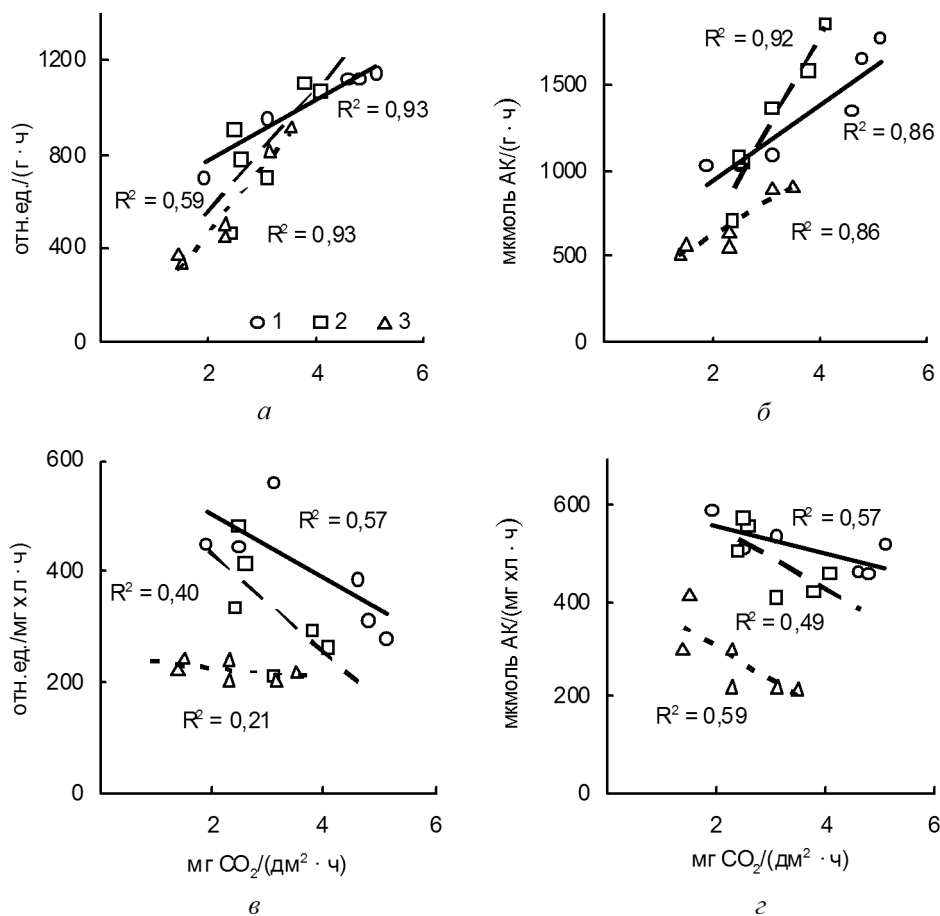


Рис. 4. Связь между интенсивностью фотодыхания и активностью СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев озимой пшеницы в расчете на массу сырого вещества (соответственно а, б), хлорофилла (соответственно в, г) по фазам развития:

1 — цветение, 2 — молочная спелость, 3 — молочно-восковая спелость

сырого вещества и на хлорофилл, имели противоположную направленность (рис. 4). Для этого явления допустимо то же объяснение, что и для интенсивности фотосинтеза.

Линии трендов для разных уровней минерального питания в расчете на массу сырого вещества практически не различались, а в расчете на хлорофилл на низком фоне минерального питания выявлена довольно тесная связь между интенсивностью фотодыхания и активностью СОД (рис. 5). Хотя уменьшение обеспечения растения элементами минерального питания приводит к снижению интенсивности фотодыхания (как и фотосинтеза), если условно взять одно и то же значение интенсивности фотодыхания, то на низком фоне питания ему будет отвечать большее значение активности антиоксидантных ферментов, чем на высоком фоне. Это подтверждает предположение, что недостаток минерального питания является своеобразным стрессовым фактором или усиливает реакции растительного организма на отклонение других факторов внешней среды от оптимальных значений, что сопровождается генерацией повышенного количества АФК и соответствующим увеличением активности антиоксидантных систем защиты.

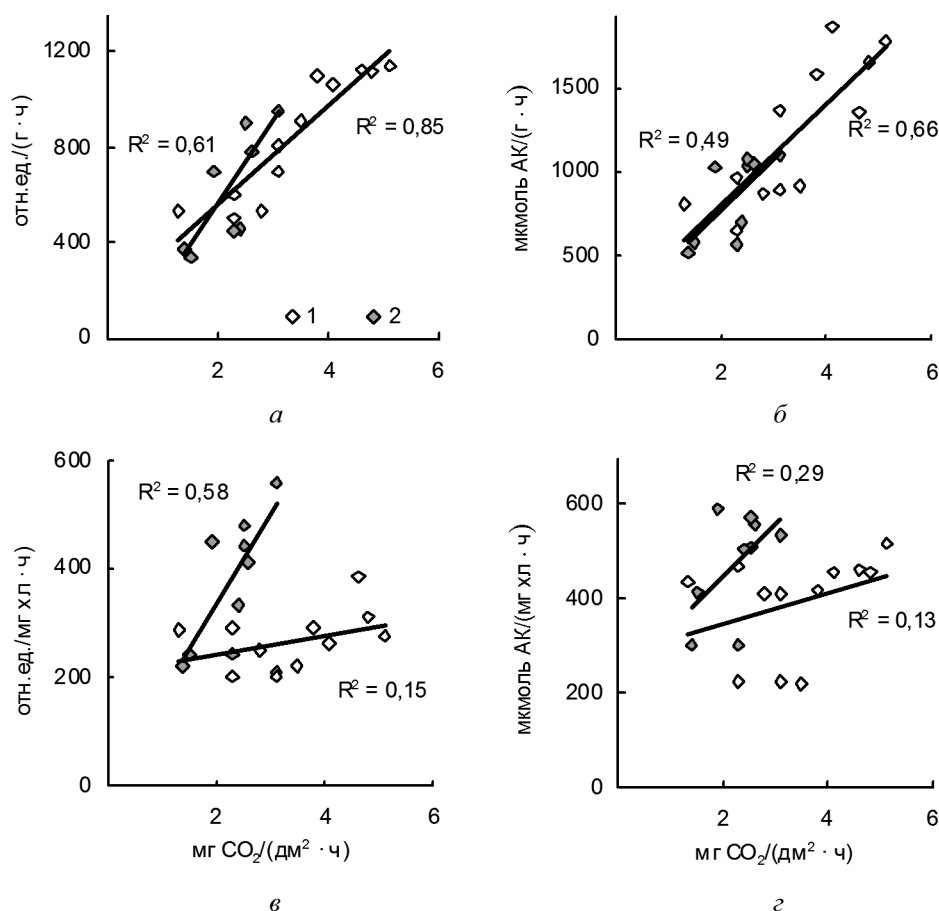


Рис. 5. Связь между интенсивностью фотодыхания и активностью СОД и АПО хлоропластов флаговых листьев озимой пшеницы в расчете на массу сырого вещества (соответственно а, б), хлорофилла (соответственно в, г) в зависимости от уровня минерального питания: 1 — высокий уровень; 2 — низкий уровень

Как и для фотосинтеза, не выявлено существенных различий линий трендов, которые аппроксимируют связи между интенсивностью фотодыхания и активностью антиоксидантных ферментов, при их построении для отдельных сортов.

Таким образом, активность основных ферментов системы антиоксидантной защиты хлоропластов — СОД и АПО — в расчете на массу сырого вещества тесно положительно коррелирует с интенсивностью углекислотного газообмена флаговых листьев растений пшеницы на свету (фотосинтез, фотодыхание) в течение периода цветения—молочно-восковая спелость. Для каждой из исследованных фаз развития выявлены положительные корреляционные зависимости между интенсивностью углекислотного газообмена на свету и активностью ферментов в расчете на массу сырого вещества и отрицательные — в расчете на хлорофилл.

У растений на низком фоне минерального питания активность антиоксидантных ферментов в расчете на хлорофилл была выше, чем на высоком фоне, при этом наблюдалась положительная зависимость между ней и интенсивностью углекислотного газообмена на свету. На высоком фоне минерального питания такой зависимости не выявлено. Это дает основания предположить, что недостаток минерального питания

является стрессовым фактором для фотосинтетического аппарата и (или) уменьшает его адаптационные возможности в переменных условиях окружающей среды, что сопровождается усилением генерации АФК при его функционировании.

Не выявлено существенных сортовых различий характера линий трендов, аппроксимирующих зависимости между интенсивностью углекислотного газообмена на свету и активностью антиоксидантных ферментов. Вместе с тем активность антиоксидантных ферментов в расчете на массу сырого вещества листьев у новых высокопродуктивных сортов Фаворитка и Смуглянка преимущественно была больше, чем у старого менее продуктивного сорта Мироновская 808, как на высоком фоне, так и при дефиците минерального питания, что соответствовало более высокой интенсивности фотосинтеза у новых сортов.

1. Моргун В.В., Кірізій Д.А. Перспективи та сучасні стратегії поліпшення фізіологічних ознак пшениці для підвищення продуктивності // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — **44**, № 6. — С. 463—483.
2. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Влияние солевого стресса на антиоксидантную систему растений в зависимости от условий азотного питания // Физиология растений. — 2006. — **53**, № 2. — С. 207—214.
3. Стасик О.О. Фотодыхание: метаболизм и физиологическая роль // Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня / Под ред. С.И. Аллахвердиева, А.Б. Рубина, В.А. Шувалова. — М.; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2013. — С. 795—825.
4. Фотосинтез и биопроductивность: методы определения / Под ред. А.Т. Мокроносова, А.Г. Ковалева. — М.: Агропромиздат, 1989. — 460 с.
5. Arnon D.I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* // Plant. Physiol. — 1949. — **24**, N 1. — P. 1—15.
6. Cai R., Zhang M., Yin Y. et al. Photosynthetic characteristics and antioxidative metabolism of flag leaves in responses to nitrogen application during grain filling of field-grown wheat // Agr. Sci. China. — 2008. — **7**, N 2. — P. 157—167.
7. Chen G.-X., Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties // Plant Cell Physiol. — 1989. — **30**, N 7. — P. 987—998.
8. Cui M.H., Ok S.H., Yoo K.S. et al. An Arabidopsis cell growth defect factor-related protein, CRS, promotes plant senescence by increasing the production of hydrogen peroxide // Plant Cell Physiol. — 2013. — **54**, N 1. — P. 155—167.
9. Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics and redox signaling // Annu. Rev. Plant Biol. — 2009. — **60**. — P. 455—484.
10. Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // Plant Physiol. — 2011. — **155**. — P. 93—100.
11. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase. Occurrence in higher plants // Ibid. — 1977. — **59**, N 2. — P. 309—314.
12. Khanna-Chopra R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation // Protoplasma. — 2012. — **249**, N 3. — P. 469—481.
13. Logan B.A., Demmig-Adams B., Rosenstiel T., Adams III W.W. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics // Planta. — 1999. — **209**. — P. 213—220.
14. Munne-Bosch S., Queval G., Foyer C.H. The impact of global change factors on redox signaling underpinning stress tolerance // Plant Physiol. — 2013. — **161**. — P. 5—19.
15. Sarvajeet S.G., Narendra T. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. — 2010. — **48**. — P. 909—930.
16. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress // Plant Cell Environ. — 2012. — **35**, N 2. — P. 259—270.
17. Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency // J. Integr. Plant Bot. — 2007. — **49**, N 3. — P. 313—322.
18. Voss I., Sunil B., Scheibe R., Raghavendra A.S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response // Plant Biol. — 2013. — **15**. — P. 713—722.

Получено 29.01.2014

ВУГЛЕКИСЛОТНИЙ ГАЗООБМІН НА СВІТЛІ ТА АКТИВНІСТЬ
АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ХЛОРОПЛАСТІВ ПРАПОРЦЕВИХ ЛИСТКІВ
ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Д.А. Кірізій, О.Г. Соколовська-Сергієнко, О.О. Стасик

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

На рослинах озимої пшениці трьох сортів, вирощених в умовах вегетаційного дослідження на двох контрастних фонах мінерального живлення, у репродуктивний період розвитку визначали інтенсивність фотосинтезу, фотодихання, активність супероксиддисмутази й аскорбатпероксидази хлоропластів прапорцевих листків. Показано, що активність головних ферментів системи антиоксидантного захисту хлоропластів у розрахунку на масу сирої речовини тісно позитивно корелює з інтенсивністю вуглекислотного газообміну прапорцевих листків рослин пшениці на світлі протягом періоду цвітіння—молочно-воскова стиглість. При аналізі даних по окремих фазах розвитку (цвітіння, молочна, молочно-воскова стиглість) виявлено позитивні кореляційні залежності між інтенсивністю вуглекислотного газообміну на світлі та активністю ферментів у розрахунку на масу сирої речовини і негативні — у розрахунку на хлорофіл.

CARBON DIOXIDE GAS EXCHANGE IN THE LIGHT AND CHLOROPLASTS
ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY OF WINTER WHEAT FLAG LEAVES

D.A. Kiriziy, O.G. Sokolovska-Sergienko, O.O. Stasik

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

Net photosynthesis and photorespiration rate, chloroplasts superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) activity of flag leaves were determined on winter wheat plants of three varieties grown in pot experiment under two contrast levels of mineral nutrition. It was shown that activity of SOD and APX closely correlated with CO₂ gas exchange rate during whole period flowering—milky-wax ripeness. Data analysis at separate growth stages (flowering, milky, milky-wax ripeness) revealed positive correlations between light CO₂ gas exchange rate and enzymes activity calculated on fresh weight, and negative ones — calculated on chlorophyll.

Key words: *Triticum aestivum* L., photosynthesis, photorespiration, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase.