

УДК 581.1

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ОБРАБОТКЕ РАСТЕНИЙ ФУНГИЦИДОМ

А.А. ИВАНОВ, Н.И. ШАБНОВА, Ю.С. ДУНАЕВА, А.А. КОСОБРЮХОВ

*Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
142290 Пущино Московской обл., ул. Институтская, 2
e-mail: demfarm@mail.ru*

Исследовали физиолого-биохимические показатели в листьях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иволга и накопление запасных белков в зерне после обработки растений фунгицидом амистар трио. При использовании препарата длительность активного функционирования листьев растений увеличивалась с поддержанием повышенной интенсивности фотосинтеза и активности нитратредуктазы, а также усиленного водного обмена за счет увеличения скорости транспирации. Удлинение жизни листьев происходило в результате снижения скорости роста и сдвига во времени точки достижения максимального размера отдельных листьев, однако это мало сказывалось на развитии репродуктивных органов. У обработанных фунгицидом растений содержание белка в зерне не увеличивалось.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., рост, нитратредуктаза, фотосинтез, фунгициды, время жизни листьев, урожайность.

Пшеница — однодольная зерновая культура, для которой характерно отмирание листьев нижних ярусов и снижение активности фотосинтетического аппарата листьев верхних ярусов с ремобилизацией азота, минеральных и органических соединений из листьев в колос на поздних стадиях онтогенеза растения [8]. Обеспеченность элементами минерального питания, среди которых главную роль играет азот, является одним из факторов, влияющих на рост и развитие растений. Основной доступной корням растений формой азота является нитратная. В корнях большинства злаковых растений утилизируется лишь малая часть поглощенных нитратов, большая их часть загружается в ксилему и с транспирационным потоком поступает в листья. В клетках листьев нитрат накапливается в двух пулах: цитоплазматическом (метаболическом) и вакуолярном (резервном) [1]. В цитоплазме клеток листа нитрат восстанавливается до нитрита с помощью нитратредуктазы (НР) (КФ 1.6.6.1), являющейся ключевым ферментом в усвоении азота [15]. Ионные потоки сквозь плазматическую мембрану и тонопласт определяют размер цитоплазматического пула нитрата, истощение которого в результате работы НР компенсируется за счет регулируемого поступления ионов из вакуолей [19]. Нитрит транспортируется в пластиды, где вместе с продуктами углеродного метаболизма принимает участие в образовании аминокислот, которые затем перемещаются по флоэме к точкам роста.

Для поддержания роста и развития в растениях выработан механизм регулирования азотного и углеродного путей их питания, важная роль в

котором принадлежит НР [10]. Световая активация фотосинтеза и связанный с ним синтез углеводов стимулируют синтез НР и ее активность [12]. Можно предположить, что продление активной работы фотосинтетического аппарата листьев пшеницы будет способствовать увеличению продуктивности растений, более высокому выходу зерна в расчете на одно растение.

Одним из подходов к продлению активной работы фотосинтетического аппарата листьев и повышению продуктивности растений является активация белоксинтезирующих процессов в листьях. С этой целью применяют препараты, способствующие росту активности НР, например такие, как фунгицид азоксистробин [20], индуцирующий повышение содержания общего растворимого белка, активность антиоксидантных ферментов и снижение уровня АФК в клетках, что приводит к значительному замедлению старения листьев [14]. Обработка растений фунгицидами значительно интенсифицирует водный обмен растений, способствуя сохранению высокого содержания воды в листьях пшеницы даже в период созревания зерна [9]. При температурном и водном стрессах показано защитное действие пропиконазола, проявляющееся в поддержании роста и обводненности листьев, активности фотосинтетического аппарата и содержания хлорофилла, увеличении выживаемости растений после окончания стрессового воздействия [6].

Для комплексного воздействия на растения разработаны новые многокомпонентные фунгициды, обеспечивающие не только подавление активности патогена на всех этапах инфицирования, но и активацию ряда метаболических процессов, повышение активности НР.

Целью настоящей работы было исследование физиолого-биохимических параметров, особенностей ассимиляционной деятельности и закономерностей накопления биомассы в связи с реализацией биологической продуктивности растений пшеницы после обработки инновационным комплексным фунгицидом амистар трио.

Методика

Растения яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иволга выращивали в условиях теплицы в период с мая по август на стеллаже, $1,40 \times 8,00$ м с 20-сантиметровым слоем серой лесной почвы, в которую предварительно был внесен комплекс макро- и микроудобрений. Посев осуществляли рядковым способом с междурядьями 7,5 см на глубину 5 см. Площадь одной учетной делянки составляла 2 м^2 , масса 1000 семян — 34,5 г, энергия прорастания — 4 сут, всхожесть — 90 %. Температурный режим выращивания — 25—35/18—20 °С (день/ночь) при относительной влажности воздуха 65 ± 5 % и ежедневном вечернем (18 ч) поливе до полного влагонасыщения почвы. Растения подкармливали комплексным НРК удобрением на 20-е сутки.

На 28-е сутки от момента прорастания, на стадии кушения, растения обрабатывали фунгицидом амистар трио опрыскиванием листьев разбавленным дистиллированной водой препаратом в соотношении 1 : 100, исходя из нормы расхода 20 мл/м^2 . В контрольном варианте листья опрыскивали дистиллированной водой. Амистар трио — фунгицид, содержащий в 1 л пропиконазол (125 г), азоксистробин (100 г), ципроконазол (30 г), подавляет активность большинства грибных патогенов зерновых культур на всех этапах развития заболевания.

Исследовали 2- и 3-й верхние листья растений. Пробы отбирали в утренние часы (8—10 ч) при естественной освещенности 400—500 мкмоль фотонов/(м² · с) и температуре 20—22 °С. Средние значения активности НР в онтогенезе листа вычисляли как сумму измеряемых значений активности фермента в период от момента обработки фунгицидом до начала засыхания листьев, деленную на количество точек измерения. Относительное накопление нитрита за время вегетации рассчитывали как суммарное его накопление, определяемое при измерении активности НР относительно контроля.

Скорость ассимиляции CO₂ и транспирации измеряли переносным газоанализатором LCPPro+ фирмы «ADC BioScientific Ltd.» (Великобритания), используя листовую камеру, в которую помещали отдельный лист.

Количество пигментов определяли спектрофотометрически после гомогенизации листьев в фарфоровой ступке (с добавлением CaCO₃) и экстракции пигментов 80 %-м ацетоном. Спектры поглощения хлорофиллов записывали на спектрофотометре Genesys 10 UV (США). В работе использован коэффициент экстинкции для 80 %-го ацетона [11].

Активность НР определяли по методу Стритер и Бослер [16] с некоторыми модификациями. Навеску листьев (750 мг) растирали в фарфоровой ступке при температуре 4 °С с 3 мл 0,1 М *трис*-НСI буфера (рН 7,4), содержащего 10 ммоль цистеина и 0,3 ммоль ЭДТА. Полученную суспензию центрифугировали при 13 000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали для дальнейших исследований. Среда инкубации содержала 1 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 200 мкл 1,4 мМ НАДН, 200 мкл 0,1 М KNO₃, 600 мкл растительного экстракта. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 30 °С в темноте. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 %-го сульфаниламида и 1 мл 0,02 %-го нафтилэтилендиамина. Через 5 мин развития окраски образцы центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 g. Об активности фермента судили по количеству образовавшегося нитрита, измеряя оптическую плотность раствора на спектрофотометре Genesys 10 UV при 540 нм индивидуально для каждого из вариантов. Раствором сравнения служил раствор, содержащий все компоненты среды инкубации, кроме НАДН. Калибровочную кривую строили по растворам нитрита в среде инкубации без растительного экстракта.

Для определения содержания водорастворимых белков в зерне пшеницы пробы гомогенизировали с помощью мельницы, полученную муку взбалтывали в дистиллированной воде в течение 10 мин, суспензию отфильтровывали сквозь бумажный фильтр. Содержание белка в растворе находили по Брэдфорду [2].

Общее содержание белка в зерне определяли в лиофилизированных образцах методом Кьельдаля с использованием анализатора Kjeltac 2300 (Foss Tecator AB, Ноеганаес, Швеция). Содержание белка рассчитывали путем умножения значений для общего азота на коэффициент 5,62 для зерна пшеницы [13].

На рисунках представлены экспериментальные данные после опрыскивания фунгицидом 28-суточных проростков пшеницы. Опыты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В таблице и на рисунках приведены средние значения и их стандартные погрешности.

Результаты и обсуждение

Установлен различный ответ растений на обработку фунгицидом в течение вегетации. В контроле в начале вегетации наблюдался активный рост растений. По достижении максимального размера листьев на 40—45-е сутки от начала прорастания семян рост растений прекращался и в дальнейшем масса их сухого вещества сохранялась на постоянном уровне (рис. 1, а). Однако на 55-е сутки вегетации масса сырого вещества растений начинала постепенно уменьшаться в связи с отмиранием листьев в период формирования колоса (см. рис. 1, б).

Скорость накопления масс сырого и сухого веществ листьев в первые две недели после обработки фунгицидом растений уменьшалась, однако в дальнейшем эти показатели достигали контрольных значений, но с некоторым сдвигом во времени.

Интенсивность поглощения CO₂ в процессе фотосинтеза в контроле была максимальной к моменту полного завершения роста листьев, а затем их фотосинтетическая активность постепенно уменьшалась (рис. 2). Действие фунгицида приводило к снижению интенсивности фотосинтеза в течение первых двух недель после обработки растений. Интенсивность транспирации обработанных фунгицидом листьев, напротив, значительно увеличивалась и превышала контрольный уровень на протяжении всего эксперимента (рис. 3). Одновременно с уменьшением интенсивности фотосинтеза в листьях обработанных фунгицидом растений снижалось содержание хлорофиллов (рис. 4), которое в дальнейшем выравнивалось в обоих вариантах эксперимента, а после 56-х суток обработанные растения превосходили по этому показателю контрольные.

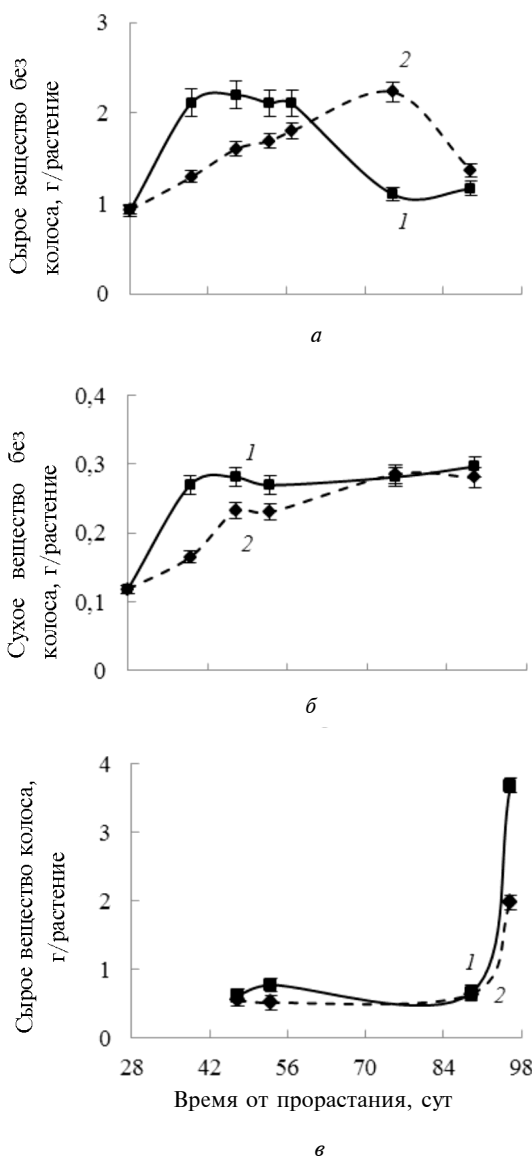


Рис. 1. Рост растений пшеницы в контрольных условиях (1) и после обработки листьев фунгицидом амистар трио (2) от момента обработки:

а, б — соответственно массы сырого и сухого вещества растения без колоса; в — масса сырого вещества колоса

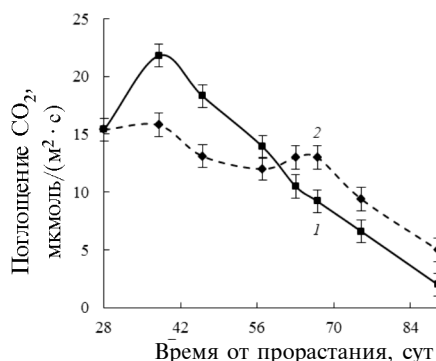


Рис. 2. Интенсивность фотосинтетического поглощения CO₂ листьями пшеницы в контрольных условиях (1) и после обработки листьев фунгицидом амистар трио (2) от момента обработки

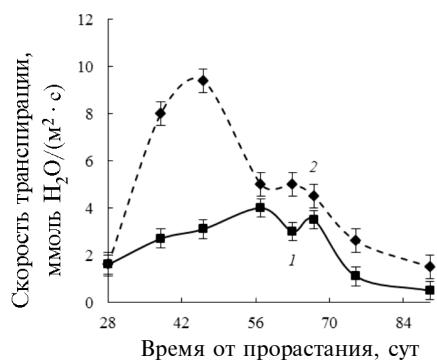


Рис. 3. Интенсивность транспирации листьев пшеницы в контрольных условиях (1) и после обработки листьев фунгицидом амистар трио (2) от момента обработки

Таким образом, мы показали, что масса сухого вещества листьев накапливалась до момента начала развития колоса. С началом интенсивного роста колоса листья постепенно отмирали, что может быть связано с перераспределением накопленных в растении минеральных и органических веществ в направлении генеративных органов [8]. Снижение интенсивности фотосинтеза и содержания хлорофиллов после обработки активно растущих листьев фунгицидом приводило к замедлению накопления массы сухого вещества вследствие дефицита синтезируемых пластических веществ. В результате скорость роста листьев уменьшалась, а время достижения ими максимального размера — увеличивалось. Визуально это проявлялось в удлинении срока жизни листьев (таблица).

В фазу колошения опытные и контрольные растения переходили практически одновременно (см. рис. 1, в), однако у обработанных фунгицидом растений зерен в колосе было меньше при одинаковой массе отдельных зерен в контрольном и опытном вариан-

тах (см. таблицу). Согласно литературным данным, число закладываемых зерен в колосе определяется в фазу выметывания пестичных столбиков и зависит от количества поглощенного азота, крайне необходимого именно в начальный период генеративного развития [5]. Дефицит азотного питания приводит к уменьшению числа зерен в колосе, но мало сказывается на массе отдельных зерен [18].

При достаточном уровне азотного питания в наших экспериментах в период активного роста листьев наблюдалась высокая активность нитратредуктазы, но к моменту закладки генеративных органов она существенно снижалась и была примерно одинаковой в контрольном и опытном вариантах (рис. 5). Средняя активность НР за период жизни листьев оставалась одинаковой в обоих вариантах (см. таблицу), однако у обработанных фунгицидом растений повышенный уровень активности НР сохранялся значительно дольше, чем в контрольном варианте, что, исходя из ростовых показателей, может быть связано с увеличением перио-

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЛИСТЬЕВ

Физиолого-биохимические показатели растений пшеницы в контроле и обработанных фунгицидом амистар трио

Вариант	Содержание белка в зерне, %		Масса зерна, мг	Число зерен в колосе, шт.	ПЖЛ, сут	Ср. НР
	водорастворимого	суммарное				
Контроль	2,78±0,14	12,4±0,5	41,3±1,6	22,67±1,14	57±3	4,53±0,23
Амистар трио	2,76±0,16	12,2±0,4	37,8±1,8	14,33±1,22	71±4	4,6±0,31

Примечание. ПЖЛ — период жизни листьев, сут; Ср. НР — средняя активность нитратредуктазы, нмоль $\text{NO}_2^-/(\text{мин} \cdot \text{г}$ массы сырого вещества) за время жизни листьев.

да жизни листьев, а не с активацией или стабилизацией фермента под действием фунгицида.

Тем не менее продление активного функционирования листьев и связанное с этим увеличение количества доступного для биосинтеза азота под действием НР у обработанных фунгицидом растений не приводило к повышению урожайности пшеницы. Масса зерна, а также содержание в нем растворимого и суммарного белка в контроле и опыте достоверно не различались. Это противоречие можно объяснить тем, что у обработанных амистаром трио растений снижалась скорость фотосинтеза. При достаточном уровне азота в клетках мог возникать дефицит углеводных компонентов при синтезе аминокислот и высокомолекулярных азотистых соединений, поскольку координация азотного и углеродного метаболизма поддерживается модулированием активностей сахарозофосфатсинтазы и НР в соответствии со скоростью фотосинтеза [4]. Этим же может быть объяснено и уменьшение числа зерен в колосе обработанных фунгицидом растений в наших исследованиях. В условиях ингибирования фотосинтеза на уровне клеток создавался искусственный дефицит азотистых

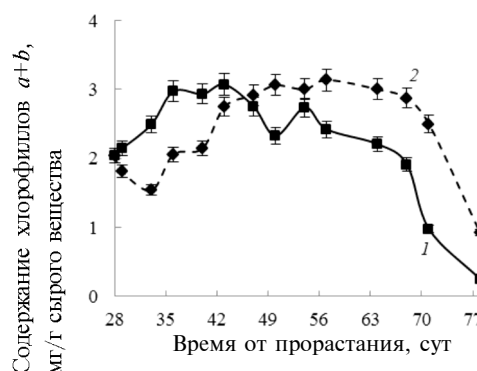


Рис. 4. Суммарное содержание хлорофиллов в листьях пшеницы в контрольных условиях (1) и после обработки листьев фунгицидом амистар трио (2) от момента обработки

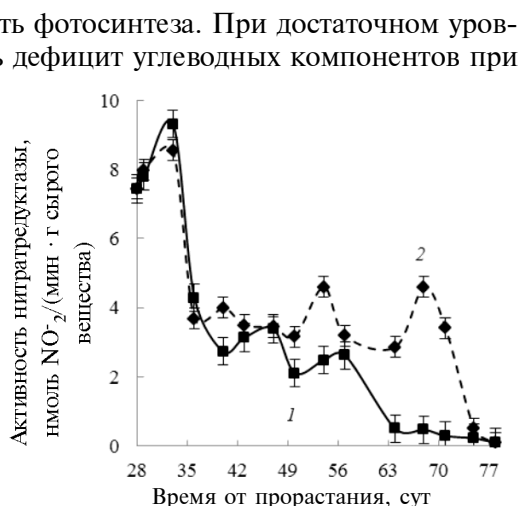


Рис. 5. Активность нитратредуктазы в листьях пшеницы в контрольных условиях (1) и после обработки листьев фунгицидом амистар трио (2) от момента обработки

соединений, что и оказывало отрицательное влияние на число формирующихся завязей.

В то же время не исключено, что масса зерна и накопление в нем запасных белков генетически запрограммированы и при оптимальных условиях выращивания мало подвержены метаболическим изменениям в вегетативных органах растения. Например, в работе [17] показано отсутствие различий параметров урожайности, включая количество зерен и их массы у растений дикого типа и дефицитных по НР мутантов. Прямая корреляция между ростом растений и активностью НР [7], а также ее динамикой в онтогенезе растений [3] не установлены.

Следует также учитывать различие между экспериментами в теплице и полевыми исследованиями. В естественных условиях произрастания использование фунгицида приводит не только к известному отрицательному действию на грибную микрофлору, но и к повышению антиоксидантного потенциала клеток как защитной реакции растения от негативных последствий окислительного стресса, возникающего при действии самых различных неблагоприятных факторов окружающей среды [20]. Кроме того, обработка фунгицидами значительно усиливает водный обмен растений [9], что в нашем случае проявлялось в резком увеличении транспирации листьев.

Таким образом, при использовании фунгицида амистар трио продлевался период жизни листьев растений пшеницы, функционирование их фотосинтетического аппарата, активность НР, усиливался водный обмен в результате повышения транспирации. Период жизни листьев увеличивался вследствие снижения скорости их роста и сдвига во времени точки достижения максимального размера органов, одинакового во всех вариантах. Задержка старения листьев приводила к потенциальному увеличению периода работы НР, а следовательно, и содержания нитритов в качестве субстрата для синтеза азотсодержащих соединений. Однако это мало сказывалось на развитии репродуктивных органов. У обработанных фунгицидом растений содержание растворимого белка и общего азота в зерне не повышалось.

1. *Aslam M., Travis R.L., Rains D.W.* Enhancement of nitrate reductase activity and metabolic nitrate concentration by methionine sulfoximine in barley roots // *Plant Sci.* — 2001. — **161**, N 1. — P. 133–142.
2. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — **72**, N 1–2. — P. 248–254.
3. *Cheeseman J., Tankou S.* Nitrate reductase and growth of *Arabidopsis thaliana* in solution culture // *Plant Soil.* — 2004. — **266**, N 1–2. — P. 143–152.
4. *Foyer C.H., Valadier M.-H., Migge A., Becker T.W.* Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves // *Plant Physiol.* — 1998. — **117**, N 1. — P. 283–292.
5. *Gallais A., Hirel B.* An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize // *J. Exp. Bot.* — 2004. — **55**, N 396. — P. 295–306.
6. *Gilley A., Fletcher R.A.* Relative efficacy of paclobutrazol, propiconazol and tetraconazol as stress protectants in wheat seedlings // *Plant Growth Regul.* — 1997. — **21**, N 3. — P. 169–175.
7. *Gojon A., Dapoigny L., Lejay L. et al.* Effects of genetic modifications of nitrate reductase expression on $^{15}\text{NO}_3$ uptake and reduction in *Nicotiana* plants // *Plant Cell Environ.* — 1998. — **21**, N 1. — P. 43–53.
8. *Himmelblau E., Amasino R.M.* Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence // *J. Plant Physiol.* — 2001. — **158**, N 10. — P. 1317–1323.

9. *Jergensen L.N., Olesen J.E.* Fungicide treatments affect yield and moisture content of grain and straw in winter wheat // *Crop Prot.* — 2002. — **21**, N 10. — P. 1023—1032.
10. *Kaiser W.M.* Regulatory interaction of carbon and nitrogen metabolism // *Prog. Bot.* — 1997. — **58**. — P. 159—163.
11. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomenbranes // *Meth. Enzymol.* — 1987. — **148**. — P. 350—382.
12. *Lillo C., Meyer C., Lea U.S. et al.* Mechanism and importance of posttranslational regulation of nitrate reductase // *J. Exp. Bot.* — 2004. — **55**, N 401. — P. 1275—1282.
13. *Mosse J., Huet J.C., Baudet J.* The amino acid composition of wheat grain as a function of nitrogen content // *J. Cereal. Sci.* — 1985. — **3**, N 2. — P. 115—130.
14. *Pasquer F., Isidore E., Zarn J., Keller B.* Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — **57**, N 5. — P. 693—707.
15. *Stitt M., Muller C., Matt P. et al.* Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism // *J. Exp. Bot.* — 2002. — **53**, N 370. — P. 959—970.
16. *Streeter J.G., Bosler M.E.* Comparison of in vitro and in vivo assays for nitrate reductase in soybean leaves // *Plant Physiol.* — 1972. — **49**, N 3. — P. 448—450.
17. *Sykorova B., Kuresova G., Daskalova S. et al.* Senescence-induced ectopic expression of the *A.tumefaciens* ipt gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield // *J. Exp. Bot.* — 2008. — **59**, N 2. — P. 377—387.
18. *Uhart S.A., Andrade F.H.* Nitrogen deficiency in maize: II. Carbon-nitrogen interaction effects on kernel number and grain yield // *Crop Sci.* — 1995. — **35**, N 5. — P. 1384—1389.
19. *Van der Leij M., Smith S.J., Miller A.J.* Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley root cells // *Planta.* — 1998. — **205**, N 1. — P. 64—72.
20. *Wu Y-X., von Tiedemann A.* Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat // *Pestic. Biochem. Phys.* — 2001. — **71**, N 1. — P. 1—10.

Получено 11.09.2012

ЗБІЛЬШЕННЯ ТРИВАЛОСТІ ЖИТТЯ ЛИСТКІВ ПШЕНИЦІ В РАЗІ ОБРОБКИ РОСЛИН ФУНГІЦИДОМ

А.О. Іванов, Н.І. Шабнова, Ю.С. Дунаєва, А.О. Кособрюхов

Інститут фундаментальних проблем біології Російської академії наук, Пушино Московської обл.

Досліджували фізіолого-біохімічні показники в листках ярої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Іволга та накопичення запасних білків у зерні після обробки рослин фунгіцидом амістар тріо. В разі використання препарату тривалість активного функціонування листків рослин збільшувалась із підтримкою підвищеної інтенсивності фотосинтезу й активності нітратредуктази, а також посиленого водного обміну за рахунок підвищення швидкості транспірації. Збільшення тривалості життя листків відбувалось у результаті зниження швидкості росту і зміщення в часі точки досягнення максимального розміру окремих листків, однак це мало позначалось на розвитку репродуктивних органів. В оброблених фунгіцидом рослин вміст запасного і розчинного білка в зерні не збільшувався.

INCREASING THE LEAVES LIFETIME IN WHEAT PLANTS TREATED WITH FUNGICIDE

A.A. Ivanov, N.I. Shabnova, Y.S. Dunaeva, A.A. Kosobryukhov

Institute of Basic Problems of Biology, Russian Academy of Sciences
2 Institutskaya St., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

Physiological and biochemical parameters in leaves of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) variety «Ivolga» and accumulation of reserve proteins in grain after treatment of plants with fungicide Amictar trio were investigated. The use of the drug led to an increase in the time of active functioning of the leaves of plants with enhanced photosynthesis and nitrate reductase activities, as well as enhanced water exchange with increasing the rate of transpiration. Lifetime of leaves increased due to reducing the growth rate and time-shift of a point of the individual leaves reaching maximum size. However, this had little effect on development of reproductive organs. Contents of reserve and soluble proteins in grain of fungicide-treated plants were not increased.

Key words: *Triticum aestivum* L., growth, nitrate reductase, photosynthesis, fungicide, lifetime of leaves, productivity.