

**ВЛИЯНИЕ ВЛАЖНОСТИ ПОЧВЫ И МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ
НА ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА И АКТИВНОСТЬЮ
РИБОНУКЛЕАЗЫ В ЗЕРНЕ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ**

Андрей БАБИЦКИЙ

Ботанический сад, г. Тирасполь

Factorul principal de care depinde în primul rând conținutul proteinei în bobul de grâu este nivelul de umiditate din sol și al nutriției minerale. Conținutul majorat de proteină, urmat de scăderea activității enzimei ribonucleaza, este indus prin deficitul de umiditate a solului. Prin urmare, sinteza proteinei de rezervă și enzimei ribonucleaza este independentă și are loc în diferite compartimente ale bobului în perioada maturizării.

Effect of soil moisture and mineral nutrition on the relationship between the protein content and activity of ribonuclease in kernels of durum wheat

The main factor determining the protein content in wheat grain is the level of soil moisture and mineral nutrition is of secondary importance. High levels of protein, followed by a decrease in the activity of the enzyme ribonuclease, are induced by deficit of soil moisture. Hence the synthesis of storage protein and the ribonuclease enzyme occur independently in different processes of wheat grains.

В серии предыдущих исследований [1-3] было показано, что главным фактором, определяющим содержание белка в зерне пшеницы, является уровень почвенной влаги при возделывании растений пшеницы, при которой репродуцируется ее зерно. При этом размах изменчивости содержания белка в зависимости от уровня влажности почвы превышает таковой, вызываемый уровнями и сочетаниями минеральных удобрений, который является минорным и включается в размах изменчивости, вызванный влажностью почвы.

Высокое содержание белка в зерне индуцируется дефицитом почвенной влаги, в то время как ее избыток приводит к снижению содержания белка до уровня 9-10%, который, очевидно, и является физиологически номинальным содержанием запасного белка в зерне пшеницы. Превышение белковитости выше этого значения идет за счет прибавления к нормальному уровню запасных белков зерновки еще и индуцируемого водным стрессом внешней среды избыточного накопления не сбалансированной по аминокислотному составу проламиновой белковой фракции, а именно – глиадинов. Отсюда глиадин классифицирован стрессовым белком, индуцируемым дефицитом почвенной влаги у пшеницы (water deficit protein) WDP [3-5].

В связи с этим возникает необходимость в выяснении следующего: существует ли количественная связь между содержанием запасного белка и уровнем ферментов в зерне, синтезируются ли ферменты синхронно с накоплением глиадина или их синтеза идут независимо. Для этого выбран фермент рибонуклеаза (РНКаза), реагирующий на водный дефицит [6,7] и выполняющий существенную роль как на стадии созревания, так и при прорастании зерна.

При переходе зерновки от стадии растяжения к стадии интенсивного синтеза запасного белка, в клетках эндосперма появляется большое количество рибосом, прикрепленных к мембранам ретикуло-эндотелиальной системы. После завершения этого процесса и перехода эндосперма зерновки к бесклеточной стадии, лизиса клеточных ядер и подготовки к процессу обезвоживания идет заключительный акт разрушения связи рибосом с мембранами, после чего уже свободные рибосомы подвергаются атаке ферментом РНКазой и на заключительной стадии гидролизуются рибосомная РНК. В результате в зрелом семени в эндосперме имеются только следы РНК, в то время как значительное количество РНКазы сохраняется и защищает сухое семя от атаки РНК-содержащей вирусной инфекции. К концу стадии созревания семян остаточное количество РНКазы в эндосперме зрелых семян достигает такого уровня, что мука из семян злаков может служить источником для выделения фермента РНКазы в препаративных целях [7].

До настоящего времени взаимосвязь между содержанием белка и активностью РНКазы не изучена и представляет значительный научный интерес в связи с влиянием минерального питания и уровня почвенной влаги при репродукции семян пшеницы, что и является предметом данного исследования.

Методы исследования

Опыт основан на изучении влияния 13 вариантов различных уровней и сочетаний минеральных удобрений при трех режимах влажности почвы на содержание белка в зерне яровой твердой пшеницы Харьковская 46 в агроэкологических условиях степной зоны юга Украины. Растения возделывали при трех режимах влажности почвы, которые здесь в тексте обозначаются под номерами как опыты: **1** - без полива, или дефицит почвенной влаги (увлажнение за счет атмосферных осадков); **2** - 75% полной почвенной влагоемкости (ППВ), или оптимум влажности почвы; **3** - избыток влаги в почве при 90% ППВ, создаваемый передвижной дождевальная установкой. Норма высева: 5 млн. семян на гектар, глубина заделки 4 см, ширина междурядий 15 см. Учетная площадь делянки 18 м². Посев произведен сеялкой точного высева, уборка комбайном Сампо. Уровни примененных удобрений представлены в таблице.

Из полученных семян на зерновых решетках для анализа были отобраны семена средней наиболее массовой фракции 2,5–2,75 мм [5-8]. Из семян получена тонкоизмельченная мука на вальцевой мельнице с вальцами из легированной стали, залитыми внутрь свинцом для их утяжеления. Полученная мука экстрагировалась в диэтиловом эфире в аппарате Соксклета от пигментов и фенольных соединений и использовалась для определения белка и активности в ней фермента РНКазы. Белок определен биуретовым методом [8] и выражен в процентах к сухому весу семян.

Активность РНКазы определялась в 0,1 М Na – ацетатном буфере pH 5,4. В центрифужные пробирки вносилось по 2 мл этого буфера и 100 мг муки и после перемешивания и 10-минутного выдерживания на водяной бане при t = 30°C в пробирки вносили по 2 мл раствора дрожжевой РНК на этом же буфере при ее концентрации 2 мг/мл. Инкубация проходила при t = 30°C в течение 12 минут. Реакцию останавливали перенесением штатива с пробирками в ледяную баню и добавлением в пробирки по 4 мл 0,25 М переохлажденного до -10°C раствора безводного MgCl₂ на 96% этаноле для осаждения РНК [9]. После 10-минутного выдерживания в ледяной бане пробирки переносили в ротор охлаждаемой до -10°C центрифуги и центрифугировали в течение 10 минут при 16 000 g. Супернатант количественно переносили в мерные колбы на 25 мл и после приведения содержимого к комнатной температуре измеряли оптическую плотность при 260 нм на спектрофотометре СФ-46. Расчет количества гидролизованной РНК производили исходя из специфической экстинкции РНК при 260 нмб, равной 0,27 при концентрации гидролизованной РНК 10 мкг/мл и длине светового пути 1 см.

Для математической обработки использовался подход изучения групповой изменчивости содержания белка и активности РНКазы с применением статистических методов анализа и последующего моделирования функциональных зависимостей на основе параметров функции распределения: средней величины и среднеквадратического отклонения, введенных в приложение **нормрасп** по программе Эксел для четкой репрезентативности полученных экспериментально данных.

Результаты и их обсуждение

Полученные экспериментальные результаты представлены в таблице, из которой видно, что увеличение влажности почвы ведет к уменьшению содержания белка и повышению активности РНКазы в зерне пшеницы. При этом влияние минерального питания на эти показатели намного меньше и вкладывается во внутрь размаха изменчивости, вызываемого уровнем влажности почвы при репродукции семян. Оценивается по коэффициенту изменчивости (КИ). Влияние минерального питания на содержание белка намного меньше, чем на активность РНКазы, и соответственно КИ содержания белка находится в пределах от 3,8% до 5%, в то время как КИ активности РНКазы находится в пределах 18-19%. Итак, активность РНКазы более отзывчива на минеральное питание, нежели содержание белка. Степень влияния уровня влажности на содержание белка и активность РНКазы оценивается

по величине относительной разницы Rd (Relative difference) их средних величин и вычисляется по формуле:

$$Rd = \frac{X_1 - X_3}{X_2},$$

где Rd – относительная разница активностей РНКазы или содержания белка, вызванных различиями уровней влажности почвы без полива и при максимальном поливе 90% ППВ;

X_1 – максимальное частное среднее;

X_2 – обобщенное среднее;

X_3 – минимальное частное среднее.

Пример вычисления Rd для показателя содержания белка: $13,3 - 10,7 = 2,6$. Обобщенное среднее: $13,3 + 11,4 + 10,7 = 35,4$; $35,4/3 = 11,8$; $Rd = 2,6/11,8 = 0,22$.

Аналогичным образом для активности РНКазы получаем: $Rd = 0,330$.

Следовательно, влияние влажности почвы на активность РНКазы более значительное, нежели на содержание белка. Влияние различий по влажности почвы на содержание белка и активность РНКазы происходит в противоположных направлениях: при высокой влажности активность РНКазы повышается, а содержание белка падает. Из направленности этих показателей можно сделать вывод, что дефицит почвенной влаги индуцирует синтез белка в зерновке пшеницы, в основном его фракцию глиадина [3-5] с одновременным падением активности фермента РНКазы. Такая ответная реакция на высокую влажность почвы путем увеличения активности РНКазы гармонирует с повышением урожайных качеств семян, репродуцированных при высокой влажности почвы. Это позволяет использовать активность фермента РНКазы в качестве теста при отборе семян с высокими урожайными качествами. По высокой активности РНКазы относительно содержания белка можно судить о высоких урожайных качествах семян.

Таблица

Влияние уровней минерального питания и режимов влажности почвы на активность РНКазы в семенах яровой твердой пшеницы Харьковская 46

Минеральное питание	Без полива		75% ППВ		90% ППВ	
	Белок, %	РНКазы, мг РНК/г белка в час	Белок, %	РНКазы, мг РНК/г белка в час	Белок, %	РНКазы, мг РНК/г белка в час
N0P0K0	12,1	248	11,1	261	10,4	240
N30P30K30	13,2	189	11	318	10,2	294
N60P60K60	13,2	189	11,9	244	10,3	262
N90P90K90	13,9	144	12,3	179	11,2	179
N0P60K60	12,6	198	10,6	283	10,4	250
N30P60K60	13,3	173	10,4	269	9,9	313
N90P60K60	13,7	131	11,6	198	11,7	205
N60K0P60	13,4	224	11,8	229	11,3	239
N60K30P60	14,1	135	11,9	227	11,1	225
N60K90P60	13,4	216	11,2	286	10,2	343
N60K60P0	13,2	182	11,2	259	10,4	288
N60K60P30	13,4	224	11,6	190	10,4	269
N60K60P90	13,2	174	11,5	174	11,1	304
Средняя величина	13,3	186,7	11,4	239,8	10,7	262,4
Среднеквадратическое отклонение	0,51	35,95	0,54	45,0	0,54	45,9
Коэффициент изменчивости %	3,8	19,3	4,7	18,8	5	17,5

Для получения более четкой репрезентативности экспериментально полученных данных, представленных в таблице, на основе средних величин и их среднеквадратических отклонений использован метод моделирования кривых нормального распределения по программе Эксель в приложении **нормрасп**. Эти данные содержания белка в зерне пшеницы представлены на рис.1, где четко видно, что семена, полученные при дефиците почвенной влаги, четко отделяются от остальных вариантов более высоким содержанием белка. Аналогичный подход, примененный к активности фермента РНКазы, представлен на рис.2. Из рисунка видно, что уровень влажности имеет прямо противоположное влияние на этот показатель. Однако семена с высокой активностью РНКазы не так четко отстоят от двух других вариантов по влажности почвы, отсюда как критерий на высокие урожайные качества семян активность РНКазы не так репрезентативна, как содержание белка.



Рис.1. Влияние влажности почвы на статистическое распределение содержания белка в зерне твердой пшеницы Харьковская-46



Рис.2. Влияние влажности почвы на статистическое распределение активности РНКазы в расчете на белок в зерне твердой пшеницы Харьковская-46

Из рис.1 видно, что главным фактором, определяющим содержание белка в зерне пшеницы, является уровень влажности почвы, а величины и сочетания минеральных питаний вкладываются в пределы кривых распределений, зависящих от влажности почвы. При этом, судя по кривым распределения содержания белка, уровень влажности почвы при 75% ППВ накладывается на данные избыточной влажности при 90% ППВ, и совершенно четко отстоит распределение повышенного содержания белка в зерне, репродуцированного при дефиците почвенной влаги.

Отсюда вполне очевидно, что повышенное содержание белка в семенах индуцируется дефицитом почвенной влаги при выращивании растений пшеницы или стрессом в водном режиме, что приводит также и к формированию семян с пониженными урожайными качествами [10-17]. Напротив, высокая влажность почвы способствует формированию низкобелковых семян пшеницы с высокими урожайными качествами.

Из вышеприведенных данных явствует, что даже один и тот же сорт или генотип пшеницы значительно варьирует по содержанию белка в зависимости от условий влажности почвы и уровней минерального питания. При этом генотип сорта не имеет решающего значения, все решает внешняя среда и главное в ней – это уровень влажности почвы, поскольку избыточное накопление белка вызвано

стрессом от дефицита влаги в почве, и избыточно накопленный белок является стрессовым белком дефицита почвенной влаги WDP [3-5].

Чтобы оценить, как связана активность фермента РНКазы, принадлежащего альбуминовой фракции запасного белка зерновки пшеницы, с общим белком, эти данные отражены в графике на рис.3.

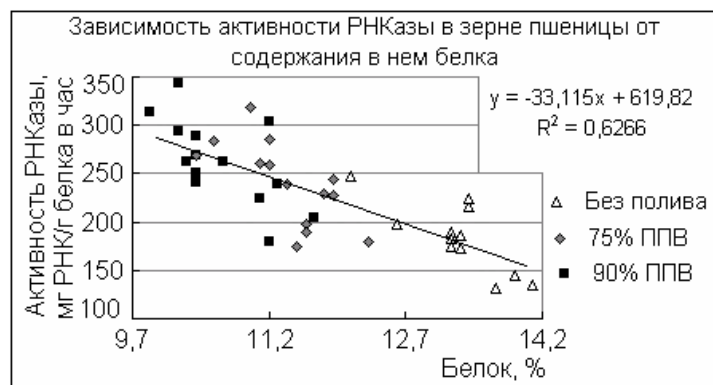


Рис.3. Влияние влажности почвы на взаимосвязь между содержанием белка и активностью фермента РНКазы в зерне твердой пшеницы Харьковская-46

На графике четко прослеживается обратная линейная зависимость между активностью РНКазы, представителем альбуминов, и общим белком, в основном представленным глиадином. Водный стресс значительно снижает активность РНКазы, поэтому можно считать, что ее синтез не протекает синхронно и не осуществляется в том же компартменте, где происходит синтез проламиновой фракции белка, поэтому РНКазу необходимо отнести к конституциональным белкам зерна пшеницы.

Выводы

Экспериментально показано, что главным фактором, определяющим содержание белка в зерне пшеницы, является уровень влажности почвы. Уровни и сочетания минеральных удобрений включаются как второстепенные факторы в общий размах изменчивости, вызываемый водным режимом растений пшеницы. РНКазы в ответ на водный стресс не активизируют свою активность подобно фракции глиадинов, а наоборот, снижают свою активность и поэтому не может быть отнесена к стрессовым белкам, индуцируемым дефицитом почвенной влаги. Она является конституциональным белком зерна пшеницы.

Литература:

1. Бабицкий А., Тома З. Влияние минеральных удобрений и влажности почвы на содержание белка в зерне пшеницы // Международный сельскохозяйственный журнал, 2008, №1, с.53-54.
2. Бабицкий А.Ф. Определяющие факторы содержания и качества белка в зерне твердой пшеницы // Агроном (Украина), 2011, № 2 (32), с.70-72.
3. Бабицкий А.Ф. Главный фактор, определяющий содержание белка и его качество в зерне твердой пшеницы // Studia Universitatis. Universitatea de Stat din Moldova. Revista științifică. Seria: Științe ale naturii. Chișinău, 2011, nr.1 (41), p.92-96.
4. Бабицкий А.Ф. Белок в зерне пшеницы: от чего зависит и чем является // Материалы XX Международного научного симпозиума. - Симферополь, 2011, с.388-393.
5. Бабицкий А.Ф. Белок зерна пшеницы – от чего зависит и чем является глиадин // Рациональное использование ресурсного потенциала регионов России и сопредельных государств: Сборник научных статей / Ред. А.А. Афонин. - Брянск: Издательство «Курсив», 2011, с.23-30.
6. Yi C., Todd G. W. Changes in ribonuclease activity of wheat plants during water stress // Physiologia plantarum, 1979, Vol.46, P.13-16.
7. Ingle J. Corn meal as a source of ribonuclease // Biochimica et Biophysica Acta, 1963, Vol.73, No.2, P.331-334.
8. Сечняк Л.К., Бабицкий А.Ф., Гармашова К.Н., Брединский А.А. Биохимические аспекты изучения урожайных качеств семян яровой пшеницы под влиянием условий минерального питания материнских растений // Пути создания исходного материала для селекции зерновых злаковых культур: Труды Всесоюзного селекционно-генетического института. - Одесса, 1976, т.14, с.12-21.

9. Razzell W. E. The precipitation of polyribonucleotides with magnesium salts and ethanol // *The Journal of Biological Chemistry*, 1963, vol.238, No.9, p.3953-3057.
10. Бабицкий А.Ф., Сечняк Л.К., Брединский А.А. Репродуктивная память семян пшеницы // *Fiziologia și biochimia plantelor de cultură (Aspecte Ecologice)*. - Chișinău, 2004, p.26-31.
11. Бабицкий А.Ф., Сечняк Л. К., Брединский А. А. Модификатор урожайных качеств семян пшеницы // *Fiziologia și biochimia plantelor de cultură (Aspecte Ecologice)*. - Chișinău, 2004, p.22-25.
12. Бабицкий А., Брединский А. Урожайные качества семян пшеницы степной зоны // *Analele științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria: Științe chimico-biologice*. - Chișinău, 2005, p.418-421.
13. Бабицкий А. Эволюция и репродуктивная память // *Genetica și ameliorarea plantelor, animalelor și microorganismelor: Materiale Congresului VIII al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova*, 29-30 septembrie 2005. - Chișinău, 2005, p.696-701.
14. Бабицкий А.Ф., Брединский А.А. Уровень влажности почвы при репродукции семян пшеницы формирует их урожайные качества // *Международная конференция. Современная физиология растений: от молекул до экосистем, Часть 3*. - Сыктывкар, 2007, с. 290-291.
15. Бабицкий А.Ф. Экологически индуцируемая наследственность пшеницы // *Проблемы биоэкологии и пути их решения: (Вторые Ржавитинские чтения): Материалы научной конференции*. Саранск 15-18 мая 2008 г. - Саранск: Издательство Мордовского университета, 2008, с.207-209.
16. Бабицкий А.Ф. Онтогенетическая наследственность культивируемых растений // *Studia Universitatis. Universitatea de Stat din Moldova. Revista științifică. Seria: Științe ale naturii*. - Chișinău, 2009, nr.6 (26), p.170-173.
17. Бабицкий А.Ф. Режим влажности почвы при выращивании пшеницы модифицирует продуктивные качества ее семян // *Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в 21 веке (Иммунитет, селекция, интродукция)*. Том 4. Часть 1. - Москва, 2011, с.373 -380.

Prezentat la 07.11.2011