

УДК 581.133

НАКОПИЧЕННЯ ДИКАРБОНОВИХ АМІНОКИСЛОТ І ЇХ АМІДІВ У ЛИСТКАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЖИВЛЕННЯ

О. Дубицький*, Г. Габрієль*, К. Ткачук**

*Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН
вул. Грушевського, 5, смт. Оброшино,
Пустомитівський р-н, Львівська обл. 81115, Україна
e-mail: agriwr@mail.lviv.ua

**Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17, Київ 03022, Україна

Показано, що у листках озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) асиміляція азоту в амінні сполуки досягає максимальних значень у фазах коло-сіння і цвітіння. За оптимальних умов живлення асиміляція азоту в аміно-кислоту у листках озимої пшениці здійснюється в основному шляхом син-тезу глутамату і глутаміну за участю ферментів глутаматсинтезного цик-лу. Асиміляція амінного азоту у формі аспартату й аспарагіну в листках цих рослин активується переважно на кінцевих етапах їх онтогенезу. Ра-зом з тим асиміляція амінного азоту в формі аспартату й аспарагіну у лист-ках рослин озимої пшениці набуває важливого значення за несприятливих умов живлення. Це є одним із механізмів адаптації рослин до асиміляції азоту за умов обмеженого синтезу вуглецевих сполук.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., живлення рослин, азот амінний, глута-мат, аспартат, глутамін, аспарагін.

Важливим етапом асиміляції амонійного азоту в амінокислоти і білки рослинної клітини є синтез у них дикарбонних амінокислот (глутамат, аспартат) і їх амідів (глутамін, аспарагін), який здійснюється за участю ферментів глутаматсинтезного цик-лу [5, 10, 20] та аспарагінсинтетази [6, 7, 10, 17, 20, 22]. Відомо [7, 20, 22], що дикарбонні амінокислоти та їх амідів, які утворюються за участю цих ферментних систем, є основною формою первинної акумуляції і транспортування органічного азоту в рослинному організ-мі. Поряд із цим отримано докази про участь цих азотистих сполук у регуляції ферментів глутаматсинтезного циклу і аспарагінсинтетази [2, 3, 6, 8, 16, 21, 23]. Тим не менше дані щодо накопичення дикарбонних амінокислот, зокрема глутамату і аспартату, та їх амідів у тканинах рослин у процесі вегетації обмежені. Практично відсутні дані щодо вмісту цих амінокислот у тканинах і органах рослин за природних умов вегетації на ґрунтах із різни-ми умовами живлення. Особливо це стосується культурних рослин, зокрема озимої пше-ниці. Це суттєво обмежує можливості оптимізації умов живлення і вирощування цих ку-льтур на ґрунтах із різними фізико-хімічними характеристиками. Тому у цій роботі вивча-ли накопичення дикарбонних амінокислот, зокрема глутамату й аспартату, та їх амідів у верхніх листках озимої пшениці за різних умов живлення.

Дослідження проводили на озимій пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Миронів-ська 61, яку вирощували у 2003–2005 рр. після конюшини лучної в умовах стаціонарно-го дослідження “Вплив довготривалого застосування добрив і вапнування на режим живлен-ня світло-сірого лісового ґрунту” Інституту землеробства і тваринництва західного регі-ону УААН.

Для досліджень було відібрано три групи дослідних ділянок (варіанти) із контрастними режимами живлення, які склались у процесі довготривалого застосування різних доз органічних і мінеральних добрив та вапнування у традиційній плодозмінній сівозміні (мг/100 г ґрунту):

1) оптимальний поживний режим ґрунту (варіант 1): азот загальний – 114,0, P_2O_5 – 16,5, K_2O – 13,8, алюміній рухомий – 0,23 (pH_{KCl} 5,36); легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання: лужногідролізований азот – 9,83, NO_3^- – 0,50, NH_4^+ – 1,25;

2) поживний режим ґрунту, із низьким вмістом елементів живлення та кислою реакцією ґрунтового розчину (варіант 2): азот загальний – 112,0, P_2O_5 – 6,5, K_2O – 4,0, алюміній рухомий – 13,70 (pH_{KCl} 4,02); легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання: лужногідролізований азот – 6,97, NO_3^- – 0,26, NH_4^+ – 2,20;

3) поживний режим ґрунту, з високим вмістом основних елементів живлення та сильно кислою реакцією ґрунтового розчину (варіант 3): азот загальний – 137,0, P_2O_5 – 26,8, K_2O – 16,8, алюміній рухомий – 15,20 (pH_{KCl} 3,70); легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання – лужногідролізований азот – 6,73, NO_3^- – 0,80, NH_4^+ – 3,39.

Відбір зразків проводили загальноприйнятими методами [9] у трьох біологічних повторностях. Відібрані рослинні зразки негайно поміщали у льодову баню і в такому стані транспортували до лабораторії. Наважку листової тканини масою 1 г гомогенізували на холоді в 0,25 М $HClO_4$ і екстрагували кислоторозчинну фракцію протягом 30 хв при 20°C. Гомогенат центрифугували 5 хв при 2000g. Отриманий супернатант нейтралізували 4М КОН до pH 7,0 і відділяли осад перхлорату калію шляхом центрифугування при 2000g протягом 5 хв. Отримані зразки зберігали при -20°C. Визначення вмісту вільних амінокислот – глутамату, аспартату та їх амідів (глутамін, аспарагін) проводили у безбілкових екстрактах листків озимої пшениці методами двомірної тонкошарової хроматографії [14, 15] на пластинках “Sorbfil” (Росія, ЗАТ “Сорб-полімер”) (рис. 1).

Хроматографування у першому напрямі проводили послідовно у двох системах – *n*-бутанол : оцтова кислота : вода – 8:2:2 та *n*-бутанол : оцтова кислота : вода – 8:3:1). У другому напрямі хроматографію проводили у системі розчинників *n*-пропанол : 25% водний розчин аміаку (7:3). Після хроматографування пластинку підсушували у термостаті при 38°C протягом 60 хв і зберігали 24 год в ексикаторі над шаром силікагелю. Пластинки обробляли нінгідриновим реактивом, який містив 0,5% нінгідрину та 1,0% оцтової кислоти у 95% водному розчині ацетону, та проявляли хроматограму протягом 60 хв у темноті при 38°C. Ідентифі-

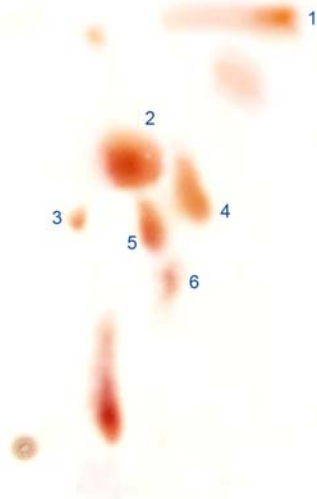


Рис. 1. Хроматограма амінокислот безбілкового екстракту листків озимої пшениці на пластинках “Sorbfil” (Росія, ЗАТ “Сорбполімер”). 1 – лейцин, 2 – глутамат, 3 – аспартат, 4 – серин+треонін, 5 – аланін, 6 – глутамін+аспарагін (варіант 1, фаза кущання).

кація проводили у безбілкових екстрактах листків озимої пшениці методами двомірної тонкошарової хроматографії [14, 15] на пластинках “Sorbfil” (Росія, ЗАТ “Сорб-полімер”) (рис. 1). Хроматографування у першому напрямі проводили послідовно у двох системах – *n*-бутанол : оцтова кислота : вода – 8:2:2 та *n*-бутанол : оцтова кислота : вода – 8:3:1). У другому напрямі хроматографію проводили у системі розчинників *n*-пропанол : 25% водний розчин аміаку (7:3). Після хроматографування пластинку підсушували у термостаті при 38°C протягом 60 хв і зберігали 24 год в ексикаторі над шаром силікагелю. Пластинки обробляли нінгідриновим реактивом, який містив 0,5% нінгідрину та 1,0% оцтової кислоти у 95% водному розчині ацетону, та проявляли хроматограму протягом 60 хв у темноті при 38°C. Ідентифі-

кацію амінокислот на дослідних хроматограмах проводили за взірцевою хроматограмою свідків амінокислот.

Кількісне визначення амінокислот (глутамат, аспартат, глутамін+аспарагін) проводили за методом Ж.В. Успенської та В.Л. Кретовича [13] з окремими модифікаціями [11]. Амінокислоти елюювали з хроматограми 75% C₂H₅OH, що містив 0,005% CuSO₄×5H₂O. Елюцію проводили при кімнатній температурі у темноті протягом 60 хв. Проби фотометрували при довжині хвилі 490 нм. Вміст амінокислот у пробах визначали за калібрувальними графіками. Зразки листків для визначення вмісту амінного азоту зберігали при - 60°C. Вміст амінного азоту визначали у водних безбілкових екстрактах листків з використанням нігдринного реактиву [12]. Вміст білка у рослинних екстрактах визначали за Лоурі [19]. Статистичний аналіз результатів досліджень проводили з використанням комп'ютерних програм Excel 7.0. У досліді використовували реактиви фірми "Сінбіас" (Україна), амінокислоти (Sigma, США).

Проведеними дослідженнями встановлено, що на ранніх фазах весняно-літнього періоду вегетації (весняне відростання – кущіння) вміст амінного азоту у листках рослин озимої пшениці в дослідних варіантах з різними умовами живлення суттєво не змінюється і залежить від вмісту азоту в ґрунті та фізико-хімічних умов його засвоєння. Починаючи із фази кущіння, у тканиних листків озимої пшениці в усіх дослідних варіантах спостерігається значне збільшення вмісту амінного азоту, яке досягає максимальних значень у фазах колосіння і цвітіння (рис. 2). Так, вміст амінного азоту в листках озимої пшениці у ці фази вегетації досягає у дослідних варіантах 156–303% від його рівня у фазу весняного відростання. Як відомо [7], основну частину амінного азоту листків рослин становить пул вільних амінокислот. Тому збільшення вмісту амінного азоту у листках рослин озимої пшениці в ході її вегетації, найбільш імовірно, відображає накопичення вільних амінокислот у листках рослин у фази інтенсивного росту і розвитку цих рослин.

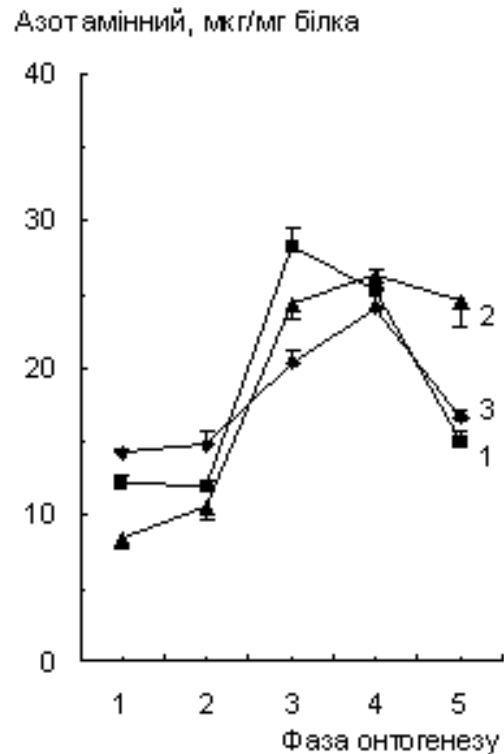


Рис. 2. Зміни вмісту амінного азоту в листках озимої пшениці у процесі її вегетації за різних умов живлення (2005 р., середні дані трьох біологічних повторностей, n=6). На осі абсцис – фаза онтогенезу: 1 – весняне відростання, 2 – трубкування, 3 – колосіння, 4 – цвітіння, 5 – молочна стиглість. На осі ординат – вміст амінного азоту, мкг/мг білка тканини: 1 – оптимальний поживний режим ґрунту (рН_{KCl} 5,36), 2 – кислий поживний режим ґрунту, з низьким вмістом елементів живлення (рН_{KCl} 4,02), 3 – сильно кислий поживний режим ґрунту, з достатнім вмістом основних елементів живлення (рН_{KCl} 3,70).

Зміни вмісту та співвідношення дикарбонових амінокислот (глутамат, аспартат) у листках озимої пшениці в її онтогенезі закономірно змінюється залежно від умов ґрунтового живлення рослин. Так, у варіанті з оптимальними умовами живлення зміни вмісту глутамату і аспартату в листках озимої пшениці в її онтогенезі мають реципрокний характер. При цьому збільшення вмісту глутамату у фазі трубкування супроводжується одночасним зменшенням вмісту аспартату у листках озимої пшениці. Зменшення вмісту глутамату на кінцевих етапах вегетації рослин, навпаки, супроводжується збільшенням вмісту аспартату у листках цих рослин (рис. 3).

У варіантах з несприятливими умовами живлення (варіанти 2 і 3) реципрокність у змінах вмісту глутамату й аспартату в листках озимої пшениці в її онтогенезі практично нівелюється. У цих варіантах невеликі коливання вмісту глутамату у тканині листків рослин у процесі їх вегетації супроводжуються значним збільшенням у тканині цих листків аспартату, яке в наших дослідках на кінцевих етапах онтогенезу перевищувало його рівень у фазі весняного відростання на 117–276% (рис. 3). Отримані результати свідчать, що несприятливі умови ґрунтового живлення озимої пшениці супроводжуються пригніченням глутаматсинтеза шляху асиміляції азоту (варіанти 2, 3). За таких умов асиміляція його у листках цих рослин активується в основному внаслідок нагромадження в них аспартату.

Вміст амідів глутамату й аспартату (глутамін, аспарагін) у листках рослин озимої пшениці в її онтогенезі поступово знижувався у всіх дослідних варіантах і на кінець вегетації рослин (фаза молочної стиглості) становив 37–55% від їх вмісту у листках цих рослин у фазі весняного відростання (див. рис. 3). На нашу думку, це пов'язано з відтіканням їх в атрагуючі органи у процесі вегетації.

Відомо [1, 18, 24], що асиміляція азоту в формі аспартату й аспарагіну є перш за все більш "економним" процесом у рослин з погляду використання атомів вуглецю. Це обумовлено відносною біологічною інертністю цих сполук, особливо аспарагіну, та низьким співвідношенням C/N порівняно з глутаматом і глутаміном, у яких це співвідношення є вищим. У зв'язку з цим перемикання метаболічного потоку азоту з глутаматси-

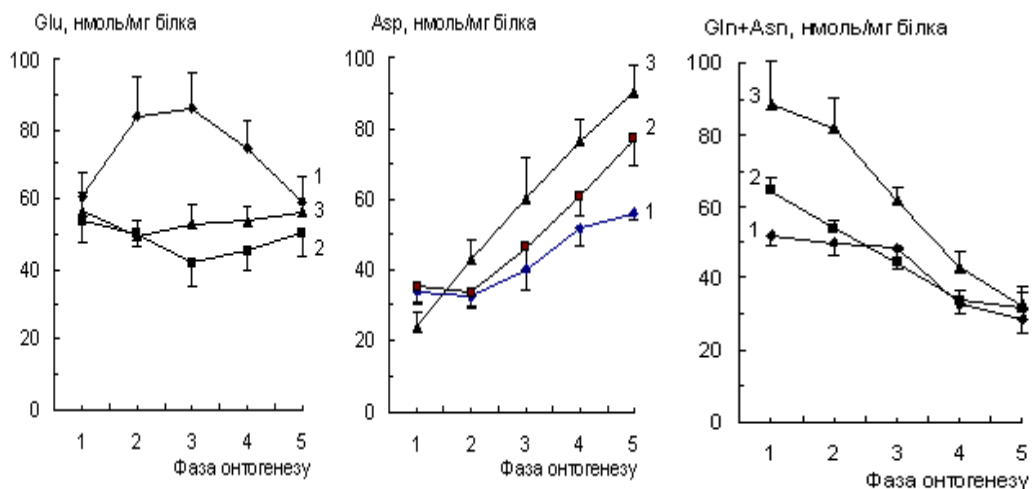


Рис. 3. Зміни вмісту глутамату, аспартату та їх амідів у листках озимої пшениці в процесі її вегетації за різних умов живлення (2005 р., середні дані трьох біологічних повторностей, n=6). На осі абсцис – фаза онтогенезу: 1 – весняне відростання, 2 – трубкування, 3 – колосіння, 4 – цвітіння, 5 – молочна стиглість. На осі ординат – вміст амінокислот, нмоль/мг білка тканини. Інші позн. див. рис.1.

нтетазного шляху його асиміляції у формі глутамату і глутаміну в напрямі переважного синтезу аспартату й аспарагіну забезпечує, насамперед, асиміляцію азоту рослинами за умов обмеженого вуглецевого живлення. Саме такі умови, ймовірно, створюються на кінцевих етапах вегетації, а також за несприятливих умов ґрунтового живлення рослин озимої пшениці [4]. Основною причиною цього є, очевидно, прискорене “старіння” хлоропластів, та, як наслідок, зменшення синтезу вуглецевих сполук.

Таким чином, встановлено, що за оптимальних умов живлення асиміляція азоту в амінокислоти у листках озимої пшениці здійснюється переважно шляхом синтезу глутамату і глутаміну за участю ферментів глутаматсинтетазного циклу. Асиміляція амінного азоту у формі аспартату й аспарагіну в листках цих рослин активується переважно на кінцевих етапах їх онтогенезу. Разом з тим асиміляція амінного азоту у формі аспартату й аспарагіну в листках рослин озимої пшениці набуває важливого значення за несприятливих умов живлення. Це є одним із механізмів адаптації рослин до асиміляції азоту за умов обмеженого синтезу вуглецевих сполук.

1. Брей С. Азотный обмен в растениях. М.: Агропромиздат, 1986. 200 с.
2. Дубицький О. Л., Габрієль Г. Й. Зміни активності глутамінсинтетази листків в онтогенезі озимої пшениці залежно від умов живлення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2006. Вип. 42. С. 128–132.
3. Дубицький О. Л., Габрієль Г. Й., Ткачук К. С. Активність глутамін- і аспарагінсинтетази в листках при вирощуванні озимої пшениці в умовах стаціонарного досліду // Фізіол. і біохім. культ. рослин. 2006. Т. 38. № 6. С. 508–514.
4. Дубицький О. Л., Габрієль Г. Й., Ткачук К. С. Фотохімічна активність хлоропластів листків озимої пшениці за різних умов живлення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 43. С. 233–240.
5. Евстигнеева З. Г. Глутаматсинтетазный цикл у растений // Прикл. биохим. и микробиол. 1993. Т. 29. № 1. С. 5–17.
6. Евстигнеева З. Г., Пушкин А. В. Глютаминсинтетаза, глютааматсинтетаза, аспарагинсинтетаза // Молекулярные механизмы усвоения азота растениями / Под ред. В.Л. Кретовича, З.Г. Евстигнеевой и др. М.: Наука, 1983. С. 198–234.
7. Измайлов С. Ф. Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 1986. 320 с.
8. Ким Э. Э., Быкова Е. В., Евстигнеева З. Г. и др. Ферменты ассимиляции аммиака у пшеницы и регуляция их синтеза // Прикл. биохим. и микробиол. 1990. Т. 26. № 3. С. 364–369.
9. Сирота Ф. Н. Основи аналітичної хімії та сільськогосподарський аналіз. К.: Вища школа, 1970. 222 с.
10. Кретович В. Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. М.: Наука, 1987. 486 с.
11. Методы экспериментальной микологии / Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. К.: Наук. думка, 1982. 550 с.
12. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. К.: Наук. думка, 1976. 334 с.
13. Успенская Ж. В., Кретович В. Л. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге // Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 43–65.
14. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. Пер. с нем. М.: Мир, 1965. 508 с.
15. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. В 2 ч. / Пер. со словацкого. М.: Мир, 1980. 621 с.
16. Campbell W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1999. Vol. 50. N 1. P. 277–303.

17. Lam H.-M., Peng S. S.-Y., Coruzzi G. M. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 106. N 4. P. 1347–1357.
18. Lea P. J., Mifflin B. J. Transport and metabolism of asparagines and other nitrogen compounds within the plant // *The Biochemistry of Plants* / Eds. P. K. Stumpf, E. E. Conn., N. Y.: Academic Press, 1980. Vol. 5. P. 569–607.
19. Lowry J. H., Rosenbrought N. J., Farr A. L. et al. Protein measurements with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
20. Mifflin B. J., Habash D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. N 370. P. 979–987.
21. Milman H. A., Cooney D. A., Huang C. Y. Studies on the mechanism of the glutamate-dependent reaction catalysed by asparagine synthetase from mouse pancreas // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255. N 5. P. 1862–1866.
22. Oliveira I. C., Brenner E., Chiu J. et al. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001. 34. N 5. P. 567–575.
23. Sivansakar S., Rothstein S., Oaks A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114. N 2. P. 583–589.
24. Urquhart A. A., Joy K. W. Use of phloem exudate technique in the study of amino acid transport in pea plants // *Plant Physiol.* 1981. Vol. 68. N 3. P. 750–754.

**THE ACCUMULATION OF DICARBONIC AMINO ACIDS
AND THEIR AMIDES WITHIN WINTER WHEAT LEAVES
UNDER DIFFERENT NUTRITION CONDITIONS**

A. Dubitsky*, A. Gabriel*, K. Tkachuk**

**Institute of Agriculture and Stockbreeding of West Region UAAS
5, Hrushevskyi St., v. Obroshyno, Lviv District 81115, Ukraine
e-mail: agriwr@mail.lviv.ua*

***Institute of Plant Physiology and Genetic NAS of Ukraine
31/17, Vasylkivska St., Kyiv 03022, Ukraine*

It is showed that the nitrogen assimilation into the amine compounds within winter wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves is reaching the maximum values during the spiking and flowering growth phases. The nitrogen assimilation into amino acids within the winter wheat leaves under the optimal nutrition conditions is carried out in the principal by the glutamate and glutamine synthesis with participation of the glutamate synthetase cycle. The assimilation of amine nitrogen into the aspartate and asparagine form within these plant leaves is activating in main on theirs final ontogenesis stages. At the same times the assimilation of amine nitrogen into the aspartate and asparagine form within the winter wheat plants leaves acquires the important significance under unfavorable nutrition conditions. It is one of the plant adaptation mechanisms to nitrogen assimilation under the conditions with the limited carbonic compounds synthesis.

Key words: *Triticum aestivum* L., plants nutrition, amine nitrogen, glutamate, aspartate, glutamine, asparagine.

Стаття надійшла до редколегії 24.09.07

Прийнята до друку 08.11.07