

УДК: 581.131

ВПЛИВ ОБРОБКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Гуляєва Г.Б., провідний інженер, Богдан М.М., провідний інженер

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

У статті наведені результати дослідження впливу позакореневої обробки біологічно активними речовинами – фунгіцидом амістар екстра 280 SC і сумішшю поживних елементів: фосфором, калієм, магнієм і міддю на ферментативну активність компонентів антиоксидантної системи: каталази, пероксидази та АТФази в коренях і листках рослин озимої пшениці. Встановлено, що зміна активності ферментів антиоксидантних систем: зменшення активності каталази (І.І.І.6) та збільшення активності пероксидази (І.І.І.7) може бути показником розвитку стійкості рослин озимої пшениці за дії біологічно активних речовин. Виявлено існування кореляційного зв'язку між співвідношенням активності антиоксидантних ферментів пероксидази/каталази та зерною продуктивністю. Встановлено, що позакоренева обробка сумішшю монофосфату калію і фунгіциду амістар екстра сприяє підвищенню зернової продуктивності озимої пшениці.

Ключові слова: озима пшениця (Triticum aestivum L.), фунгіцид, мінеральне добриво.

Гуляєва А.Б., Богдан М.М. Влияние обработки биологически активными веществами на ферментативную активность компонентов антиоксидантной системы и продуктивность растений озимой пшеницы / Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина.

В статье приведены результаты исследования влияния внекорневой обработки биологически активными веществами – фунгицидом амистар экстра 280 SC и смесью питательных элементов: фосфором, калием, магнием и медью на ферментативную активность компонентов антиоксидантной системы: каталазы, пероксидазы и АТФаза в корнях и листьях растений озимой пшеницы. Предложено использовать изменение активности ферментов антиоксидантных систем каталазы (I.I.I.6) и пероксидазы (I.I.I.7) для предварительной оценки влияния биологически активных веществ на развитие устойчивости растений озимой пшеницы. Обнаружено существование корреляционной связи соотношения активности антиоксидантных ферментов пероксидазы / каталазы с зерновой продуктивностью. Установлено, что внекорневая обработка смесью монофосфатом калия и фунгицида амистар экстра способствует повышению зерновой продуктивности озимой пшеницы.

Ключевые слова: озимая пшеница (Triticum aestivum L.), фунгицид, минеральное удобрение.

Gulaeva A.B., Bogdan M.M. Effect of treatment with biologically active substances to the enzymatic activity of antioxidant system and productivity of plants winter wheat / Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine.

The protection of plants is an integral component of agricultural technologies and may increase crop yields. The article shows the results of a study influence of foliar treatment plant winter wheat biologically active substances - of fungicide amistar extra and a mixture of nutrients: phosphorus, potassium, magnesium and copper on activity of antioxidant enzymes. The changes in enzyme activity of antioxidant systems: increased activity of peroxidase (I.I.I.7) and decreased activity of catalase (I.I.I.6) can be an indicator of increasing wheat plant adaptation and plant resistance of winter wheat. Found that foliar treatment with a mixture of mono potassium phosphate and fungicide amistar extra improves grain productivity of winter wheat. Observed the existence a correlation ratio of antioxidant enzymes peroxidase / catalase with grain output.

Key words: winter wheat (Triticum aestivum L.), fungicide, fertilizer.

ВСТУП

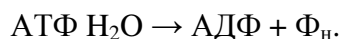
Сучасні сорти рослин мають досить обмежений потенціал стійкості проти шкідливих організмів. Тому захист рослин є невід'ємним компонентом агротехнології та може підвищувати врожайність сільськогосподарських культур на 23 % і більше [1-3]. Найвищу рентабельність можна отримати, застосовуючи препарати, що діють проти комплексу хвороб [1, 2].

Відомо три групи механізмів стійкості рослин до стресових факторів: 1) стрес-індуковане новоутворення макромолекул із захисними властивостями, 2) синтез спільних осмолітів з множинними протекторними функціями, 3) антиоксидантні системи [4, 5]. Однією з ранніх відповідей на дію стресових факторів є утворення на клітинній поверхні активних форм кисню (АФК), зокрема супероксиду і пероксиду водню [5, 6]. Клітинною системою захисту від цих радикалів і їх похідних є антиоксидантна система. До антиоксидантних ферментів відносяться супероксидисмутази, каталази, пероксидази та ін. Їх синтез індукується у відповідь на підвищення рівня вільних радикалів [5]. За літературними даними, пероксидаза пов'язана з цілим рядом метаболічних перетворень, що відбуваються в клітині [4, 7].

Важлива роль каталази відома в якості однієї з термінальних оксидаз рослинної клітини, що відповідає за розкладання перекису, та фактору, що бере участь у регуляції зміни фаз аеробних і анаеробних процесів, окисленні перекисів в пероксисомах при фотодиханні [5]. Встановлено, що розчинні пероксидази, представлені цитоплазматичною та слабо зв'язаною з клітинною стінкою ферментативними формами, які найбільш чутливі до впливу стресових факторів. Одним з основних механізмів системної фітостійкості, вважається утворення активних форм кисню, в тому числі перекису водню, в зв'язку з цим, рядом авторів запропоновано в якості біоіндикаторів розвитку стійкості рослин визначати зміну активності розчинних і слабо зв'язаних з клітинною стінкою форм пероксидаз [8].

Дослідженню впливу різних абіотичних факторів на пероксидазну активність присвячені численні роботи [6-12]. Вивчаючи вплив різних факторів на пероксидазну активність соку коренів хрону, Давидова встановила, що хімічний склад соку і його пероксидазна активність залежать від факторів, що визначають умови росту рослин - кількості вологи, складу ґрунту і освітленості. У дослідженнях Г.Ф. Давидова та О.А. Ярмакова встановили зв'язок пероксидазної активності лікарських трав від температури навколишнього середовища [1].

Представляють також інтерес дослідження Половникова М.Г., рослин у районах з різним рівнем забруднення атмосферного повітря, яким виявлені достовірні зміни активності залізовмісних ферментів: збільшення активності пероксидази і деяке зниження активності каталази. При цьому стійкі види рослин в порівнянні з нестійкими характеризувалися більш низькими значеннями даних показників [4]. В якості ферменту, активність якого може свідчити про забезпеченість рослин фосфатами у вигляді макроергічних зв'язків АТФ та показником стійкості рослин, ми визначали активність ферменту АТФази. АТФаза рослинних тканин складається з декількох ферментативних систем, біологічна роль яких ще недостатньо повно вивчена. АТФази звільняють енергію пірофосфатних зв'язків при гідролізі АТФ:



У зв'язку з цим АТФазі належить велика роль на заключному етапі енергетичного обміну клітини.

У мітохондріях знайдено кілька АТФаз, що активуються двовалентними катіонами (Ca^{2+} , Mg^{2+}) та розрізняються за характером залежності від рН середовища.

Показано, що фосфор активує мембранну H^+ -АТФазу, яка підтримує цитоплазматичний рН і регулює мембранний іонний транспорт [13]. Первинно-активний транспорт іонів в більшості випадків здійснюється транспортними АТФазами (іонними насосами), джерелом енергії для яких є гідроліз АТФ або пірофосфату. У мембранах хлоропластів і мітохондрій при роботі систем первинно-активного іонного транспорту джерелом енергії є діяльність окисно-відновних ланцюгів. Особливу роль у створенні різниці потенціалів на мембрані належить мембранному ферменту H^+ -АТФазі. Її функція полягає в тому, що вона перекачує протони з клітини назовні, підтримуючи рН цитоплазми близько до нейтрального

(що важливо для протікання багатьох ферментативних процесів), а також створює на мембрані різницю потенціалів, значно визначаючи електричні властивості вищих рослин [13, 14].

Метою досліджень було визначення впливу різних факторів, таких як обробка фунгіцидом і позакоренева обробка поживними елементами на ферментативну активність пероксидази, каталази - компонентів антиоксидантної системи, а також АТФазну активність коренів рослин озимої пшениці в середині вегетації та зв'язок цих заходів із зерновою продуктивністю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження впливу обробки біологічно активними речовинами на активність антиоксидантних ферментів проводили в лабораторних та вегетаційних умовах. Лабораторний дослід проводився за схемою: 1. Контроль: $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 ммоль/л P); 2. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 ммоль/л P) + обробка 3 %-м р-ном монофосфат калію (МФК); 3. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 ммоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МФК + 2 %-м р-ном $MgSO_4$ + 0,05 % $CuSO_4$.

Веgetаційні досліді проводили у вегетаційному будиночку на території Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Об'єкт дослідження - озима пшениця сорту Фаворитка. Рослини, по 12 штук, вирощували в посудинах Вагнера на 8 кг сірого опідзоленого ґрунту на варіантах без обробки і з обробкою рослин фунгіцидом амістар екстра 280 SC в фазі кушіння, виходу в трубку та цвітіння-колосіння. Схема досвіду:

1. Контроль $N_{90}K_{90}P_{45}$;
2. $N_{90}K_{90}P_{45}$ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МФК;
3. $N_{90}K_{90}P_{45}$ + обробка амістар екстра 280 SC;
4. $N_{90}K_{90}P_{45}$ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МФК + 2 %-й розчин $MgSO_4$ + 0,05 % $CuSO_4$ + обробка амістар екстра 280 SC.

Активність антиоксидантних ферментів визначали на другу добу після обробки біологічно активними речовинами. Активність ферменту каталази (І.І.І.6) визначали титрометричним методом, а пероксидази (І.І.І.7) – за методом Бояркіна [4] і виражали в умовних одиницях на мг сирої ваги тканин. Активність ферменту каталази (І.І.І.6) виражали у кількості O_2 , що утворився в результаті дії ферменту за 1 хв на 1 г сирої речовини ($мл O_2 \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$). Визначення активності ферменту АТФази в тканин коренів озимої пшениці проводили за методом, що оснований на визначенні приросту неорганічного фосфору в середовищі в ході АТФазної реакції. Реакцію починали з додавання в зразки розчину АТФ відповідної концентрації та припиняли, додаючи розчин ТХУ. Оптичну щільність вимірювали на ФЕК. Активність ферменту визначали за кількістю неорганічного фосфату, відщепленого від аденозинтрифосфату АТФ-азою та виражали в $мкг P \cdot г^{-1}$ сирої речовини $\cdot год^{-1}$ [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати визначення активності ферментів антиоксидантної системи каталази і пероксидази в коренях 14-денних рослин озимої пшениці свідчать про вплив позакореневої обробки на показники активності ферментів, що входять до антиоксидантної системи. Нашими дослідженнями (табл. 1) встановлено зниження активності каталази на 25 % за позакореневої обробки 3 %-м розчином МФК і в 1,7 рази - з 1,28 до 0,74 $мл O_2 \cdot г^{-1} \cdot хв^{-1}$ за позакореневої обробки сумішшю елементів живлення P + Mg + Cu. Поряд з цим активність пероксидази в коренях дещо зросла - на 17,5 % при обробці МФК і майже вдвічі - при позакореневої обробці сумішшю елементів живлення P + Mg + Cu.

За дослідженнями В.С. Миколаївського [15], існує зв'язок посилення аеробного дихання із зростанням активності термінальних оксидаз. За його даними зміна якості та

активності окисно-відновних ферментів може служити не тільки певним показником реакції рослинного організму до несприятливих факторів середовища, але і для оцінки пристосування рослин до умов існування. Тому зміна активності антиоксидантних ферментів в тканинах коренів 14-денних рослин (підвищення активності пероксидази і зниження активності каталази) може бути показником підвищення адаптивних можливостей рослин в умовах позакореневої обробки, оскільки реакція на будь-які впливи на рослинний організм є неспецифічною.

Таблиця 1 – Вплив позакореневої обробки розчином суміші елементів мінерального живлення на ферментативну активність в тканях коренів 14- денних рослин озимої пшениці (лабораторний дослід)

Контроль: ½ X-A + 1/4 P (0,06 ммоль/л P)	½ X-A + 1/4 P (0,06 ммоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м МФК	½ X-A + 1/4 P (0,06 ммоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м МФК + 2 %-м р-ном MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄
Активність каталази (I.II.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)		
1,28±0,06	0,96±0,05	0,74±0,04
Активність пероксидази (I.II.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹		
1,37±0,7	1,61±0,07	2,92±0,1

Визначення активності каталази і пероксидази в прапорцевих листках озимої пшениці в фазі колосіння-цвітіння в умовах вегетаційного дослідження мало подібну тенденцію (табл. 2).

Таблиця 2 – Ферментативна активність у листках рослин озимої пшениці за дії позакореневої обробки розчином суміші біологічно активних речовин і елементів живлення (вегетаційний дослід)

Контроль: N₉₀K₉₀ P₄₅	N₉₀K₉₀ P₄₅ + 3 %-й р-н МФК + амістар екстра 280 SC	N₉₀K₉₀ P₄₅ + амістар екстра 280 SC	N₉₀K₉₀ P₄₅ + 3 %-й р-н МФК + 2 %-й р-н MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄ + амістар екстра 280 SC
Активність каталази (I.II.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)			
1,15±0,05	1,06±0,05	0,43±0,02	0,85±0,05
Активність пероксидази (I.II.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹			
0,115±0,01	0,197±0,01	0,198±0,01	0,124±0,01

Активність ферменту каталази знизилася на 7,8 % (при позакореневій обробці 3 %-м р-ном МФК + амістар екстра) і на 37 % (тільки при обробці фунгіцидом), обробка ж рослин озимої пшениці багатоконпонентною сумішшю знижувала каталазну активність - на 26 %. Пероксидазна активність при цьому збільшилася на 0,082 г⁻¹ · с⁻¹ як при обробці 3 %-м р-ном МФК так і додаванні до нього фунгіциду (табл. 2). В останньому варіанті, як і у випадку з каталазою зміни активності були не настільки значні, тобто пероксидазна активність підвищилася з 0,115 до 0,124 г⁻¹ · с⁻¹. Визначення АТФазної активності в коренях у фазу колосіння-цвітіння показало підвищення активності ферменту при обробці амістар екстра з 158,7 до 190,4 тобто на 31,7 мкг Р · г⁻¹ сир. ваги · г⁻¹, при обробці сумішшю фунгіциду і 3 % р-ну МФК в 3,3 рази і при обробці сумішшю Р + Mg + Cu + амістар екстра в 3,8 разів (рис. 1).

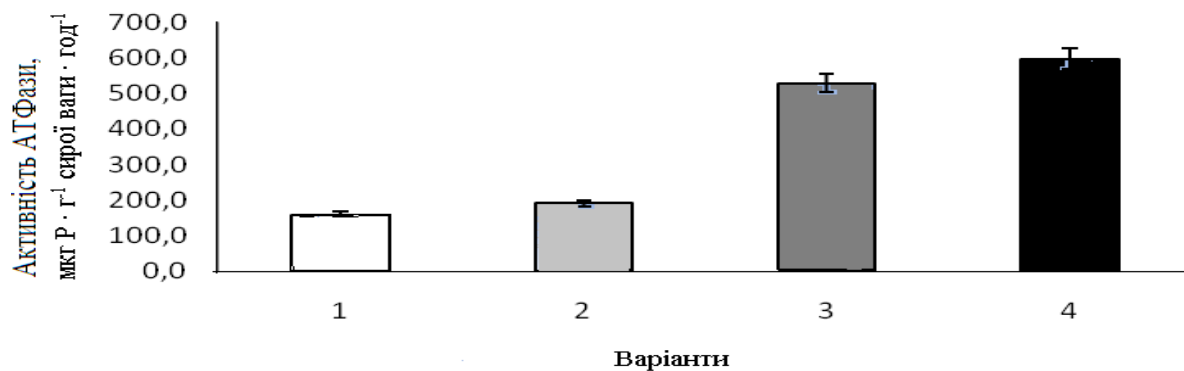


Рисунок 1 – Вплив позакореневої обробки фунгіцидом і сумішшю елементів живлення на АТФазну активність коренів озимої пшениці сорту Фаворитка (вегетаційний дослід).

- Варіанти: 1. Контроль N₉₀K₉₀P₄₅;
 2. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МФК;
 3. N₉₀K₉₀P₄₅ + обробка амістар екстра 280 SC;
 4. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МФК + 2 %-й розчин MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄

Відомо, що активність ферменту АТФази повинна корелювати з вмістом АТФ, більша частина молекул якої синтезуються в результаті дихальних процесів. У такому випадку, збільшення АТФазної активності узгоджується з даними, описаними в роботі В.С. Миколаївського [15], в якій він відзначив ефект посилення аеробного дихання як одного з проявів захисних реакцій тканин і встановив зв'язок цього фактора з ростом активності термінальних оксидаз.

Також нами був виявлений вплив позакореневої обробки рослин озимої пшениці досліджуваними біологічно активними речовинами на зернову продуктивність, яка зросла з 16,2 до 21,7 г/посудину за обробки сумішшю 3 %-м р-ном МФК + амістар екстра. Застосування обробка ж рослин озимої пшениці багатокомпонентною сумішшю знижувала зернову продуктивність, завдяки антагоністичній дії окремих компонентів суміші.

Таблиця 3. Зернова продуктивність озимої пшениці за обробки біологічно активними речовинами, г/посудину.

Контроль: N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МФК+ амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МФК + 2 %-й р-н MgSO ₄ + 0,05 % CuSO ₄ + амістар екстра 280 SC
16,2±0,1	21,7±0,2	16,0±0,1	14,4±0,05

З літературних джерел відомо, що адаптивні реакції можуть впливати на урожай зерна позитивно чи негативно, оскільки за дії стресових чинників стійкіша рослина буде продуктивнішою [16], що є результатом конкуренції за енергетичний матеріал. Адаптація включає в собі всі процеси — анатомічні, морфологічні, фізіологічні тощо. Як правило, найчутливіші до дії несприятливих чинників молоді рослини, що активно ростуть. У подальшому стійкість рослин поступово збільшується до початку закладання квіток.

У період формування гамет, цвітіння, запліднення рослини знову стають дуже чутливими до несприятливих умов. Далі їх стійкість знову підвищується аж до дозрівання насіння [5, 16].

Тому доцільно було прослідкувати взаємозв'язок між зміною активностей антиоксидантних ферментів та продуктивністю рослин озимої пшениці на ранніх етапах розвитку для виявлення оптимальних доз біологічно активних речовин та їх суміші з елементами живлення для формування зернової продуктивності.

Отже, за даними статистичного аналізу був виявлений тісний кореляційний зв'язок між зерною продуктивністю і співвідношенням активності антиоксидантних ферментів: пероксидази/каталази ($r=0,889$) (рис. 2), хоча між активністю окремих ферментів тісного кореляційного зв'язку встановлено не було.

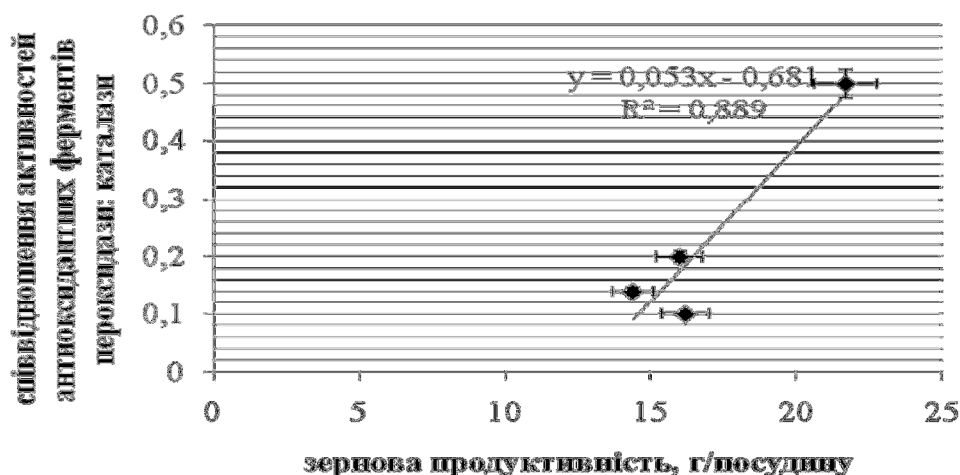


Рисунок 2 – Залежність між зерною продуктивністю за впливу обробки біологічно активних речовин та співвідношенням антиоксидантних ферментів : пероксидази/каталази.

Найбільшим це співвідношення виявилось на варіанті з обробкою сумішшю 3 %-м р-ном МФК + амістар екстра, що також характеризувався підвищеною АТФазною активністю.

Отже, оптимальним за впливом біологічно активних речовин на продуктивність рослин озимої пшениці виявився варіант обробки розчином суміші фунгіциду амістар екстра 280 SC та 3-% МФК, що характеризувався також найбільшим співвідношенням активностей ферментів антиоксидантних систем пероксидази/каталази.

ВИСНОВКИ

Таким чином, позакоренева обробка рослин фунгіцидом амістар екстра окремо і в суміші з елементами живлення призводить зміни активності ферментів антиоксидантних систем: збільшення активності пероксидази (І.П.І.7) та зниження активності каталази (І.П.І.6), що є показником розвитку стійкості рослин озимої пшениці до несприятливих чинників довкілля.

Виявлено існування кореляційного зв'язку співвідношення активності антиоксидантних ферментів пероксидази/каталази із зерною продуктивністю.

Позакоренева обробка сумішшю монофосфат калію і фунгіциду амістар екстра сприяє підвищенню зернової продуктивності озимої пшениці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гулидова, В.А. Ресурсосберегающая технология озимой пшеницы / В.А. Гулидова. – Липецк: ООО «Центр полиграфии», 2006. – 400 с.
2. Клуб 100 центнерів. Сорти та технології вирощування високих урожаїв озимої пшениці / [В.В. Моргун, Є.В. Санін, В.В. Швартау, О.А. Омеляненко. – К.: Ін-т фізіології рослин і генетики Нац. акад. наук України, Компанія «Сингента», Швейцарія. – 2010. – 105 с.
3. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. – Дніпропетровськ: Арт-прес, 2006. – 318 с.
4. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии: учебное пособие / О.Л. Воскресенская, Е.А. Алябышева, М.Г. Половникова. – Йошкар-Ола, Марийский государственный университет., Ч. 1. – 2006. – 107 с.
5. Кузнецов, В.В. Физиология растений / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
6. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г.В. Удовенко. – Л.: Колос, 1976. – 318 с.
7. Bolwell, G.P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense - a broad perspective / G.P. Bolwell, P. Wojtaszek // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1997. – vol. 51. – P. 347 -366.
8. Граскова И.А. Активность и изоферментный спектр пероксидазы листьев некоторых видов травянистых растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе / Граскова И.А. Живетьев М.А., Путилина Т.Е. и др. [Электронный ресурс] // Электронный научный журнал «Исследовано в России». – 2010. – 023. – С. 293–303. – Режим доступа к журн.: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2010/023.pdf>.
9. Аверьянов А.А. Пероксидазная активность выделений здоровых и зараженных пирикулярриозом листьев риса / А.А. Аверьянов, В.П. Лапикова // Доклады академии наук. – 1995. – Т. 350, № 5. – С. 702–704.
10. Давыдова Г.Ф. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза / Г.Ф. Давыдова, О.А. Ермаков, А.И. Панасенко, А.М. Тищенко // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 15–18.
11. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М.Н. Мерзляк // Итоги науки и техники: ВИНТИ. – Сер. Физиология растений, 1989. – Т. 6. – 167 с.
12. Моргун В.В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В.В. Моргун, В.В. Швартау, Д.А. Киризий // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – 42, № 5. – С. 371–393.
13. Биофизика: учебник для вузов / [Антонов В.Ф., Черныш А.М., В.И. Пасечники др.]; под ред. В.Ф. Антонова. – [1-е изд.] – М. : Владос, 2000. – 283 с.
14. Трофимова М.С. Н⁺-АТФаза плазмалеммы как компонент рН-стата цитозоля изолированных протопластов / М.С. Трофимова // Физиология растений. — 1992. — 39, № 1. — С. 5—14.
15. Николаевский, В.С. Эколого-физиологические основы газоустойчивости растений / В.С. Николаевский. – М., 1998. – 64 с.
16. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений / Т.В. Чиркова // СПб.: Изд-во СПбУ, 2002. – 244 с.