

УДК 581.133.134

**О.Л. ДУБИЦЬКИЙ, науковий співробітник**

Інститут землеробства і тваринництва західного регіону НААН

**К.С. ТКАЧУК, доктор біологічних наук**

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

## **РЕГУЛЯЦІЯ ЦУКРАМИ АКТИВНОСТІ ГЛУТАМІНСИНТЕТАЗИ І АСПАРАГІНСИНТЕТАЗИ ЛИСТКІВ В ОНТОГЕНЕЗІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПОЖИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ**

*Досліджували активність глутамін- та аспарагінсинтетази у верхніх листках озимої пшениці в онтогенезі, залежно від вмісту у них цукрів (сахароза, фруктоза, глюкоза), за різних умов забезпечення поживними речовинами. Між активністю глутамінсинтетази та рівнем сахарози у верхніх листках рослин встановлено тісні негативні кореляційні зв'язки за оптимального рівня живлення (достатній вміст основних елементів,  $pH_{КСІ}$  ґрунтового розчину – 5,36). Активність аспарагінсинтетази при цьому не залежить від вмісту цукрів у листках. Несприятливі умови (підвищена кислотність ґрунтового розчину ( $pH_{КСІ}$  3,70 – 4,02) і низький або достатній вміст основних елементів живлення) супроводжуються переважно тісними негативними кореляційними зв'язками між активністю обох ферментів та рівнем цукрів у листках озимої пшениці. Запропоновано гіпотезу про те, що за природних умов вегетації цієї культури цукри можуть функціонувати лише як негативні регулятори активності глутамін- та аспарагінсинтетази.*

**Ключові слова:** озима пшениця *Triticum aestivum* L., сахароза, фруктоза, глюкоза, глутамінсинтетаза, аспарагінсинтетаза.

© Дубицький О.Л., Ткачук К.С., 2010

Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. 2010. Вип. 52. Ч. II.

В останні десятиріччя отримано вагомі докази регуляції активності та синтезу ключових ферментів асиміляції азоту рівнем цукрів у тканинах рослин. Зокрема, продемонстровано, що інфільтрація сахарози у паростки рослин *Arabidopsis thaliana* L. супроводжується нагромадженням у листках мРНК хлоропластної і меншою мірою цитозольної глутамінсинтетази [17]. Такі ж результати було отримано після дії на ці рослини глюкози і фруктози. Про взаємозв'язок між активністю глутамінсинтетази у тканинах рослин та вмістом у них фотоасимілятів свідчать також дані інших авторів [10, 24]. У багатьох літературних джерелах узагальнено результати досліджень щодо активуючого впливу цукрів на експресію генів глутамінсинтетази, глутаматсинтетази та аспарагінсинтетази [15, 23]. Тим не менше дія цих метаболітів на активність ферментів асиміляції азоту у цілісній рослині може бути неоднозначною. Так, у паростках *A. thaliana* та соняшнику експресія генів різних ізоферментів аспарагінсинтетази репресується або активується під впливом сахарози [8, 11]. Напрямок такої регуляторної дії сахарози залежить від рівня освітленості рослин та забезпечення їх амонійною формою азоту.

Показано, що активність ключових ферментів асиміляції азоту, зокрема глутамінсинтетази, у тканинах культурних рослин тісно пов'язана з параметрами їх продуктивності [16]. Разом з тим дані щодо можливої участі цукрів у регуляції активності цих ферментів у тканинах зернових культур, і зокрема пшениці озимої, за вегетації на ґрунтах з різними умовами забезпечення поживними речовинами практично відсутні.

Метою цієї роботи було дослідити активність ключових ферментів первинної асиміляції амонійного азоту у верхніх листках озимої пшениці в онтогенезі, залежно від вмісту цукрів (сахароза, фруктоза, глюкоза), за різних умов забезпечення поживними речовинами.

Дослідження проводили на озимій пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Миронівська 61, яку вирощували в умовах стаціонарного досліді Інституту землеробства і тваринництва західного регіону УААН. Для досліджень було відібрано три групи дослідних ділянок (варіанти) з контрастними умовами забезпечення рослин поживними речовинами (мг/100 г ґрунту):

а) оптимальні умови, вар. 7 (1) – азот загальний – 114,0,  $P_2O_5$  – 16,5,  $K_2O$  – 13,8 ( $pH_{KCl}$  5,36, алюміній обмінний – 0,23), легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання: лужногідролізований азот – 9,83,  $NO_3^-$  – 0,50,  $NH_4^+$  – 1,25;

б) несприятливі умови з низьким вмістом елементів живлення та більш кислою реакцією ґрунтового розчину, вар. 1 (2) – азот загальний – 112,0,  $P_2O_5$  – 6,5,  $K_2O$  – 4,0 ( $pH_{KCl}$  4,02, алюміній обмінний – 13,70), легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання: лужногідролізований азот – 6,97,  $NO_3^-$  – 0,26,  $NH_4^+$  – 2,20;

в) несприятливі умови з достатньо високим вмістом основних елементів живлення та сильнокислою реакцією ґрунтового розчину, вар. 15 (3) – азот загальний – 137,0,  $P_2O_5$  – 26,8,  $K_2O$  – 16,8 ( $pH_{KCl}$  3,70, алюміній обмінний – 15,20), легкозасвоювані форми азоту на початку фази весняного відростання: лужногідролізований азот – 6,73,  $NO_3^-$  – 0,80,  $NH_4^+$  – 3,39.

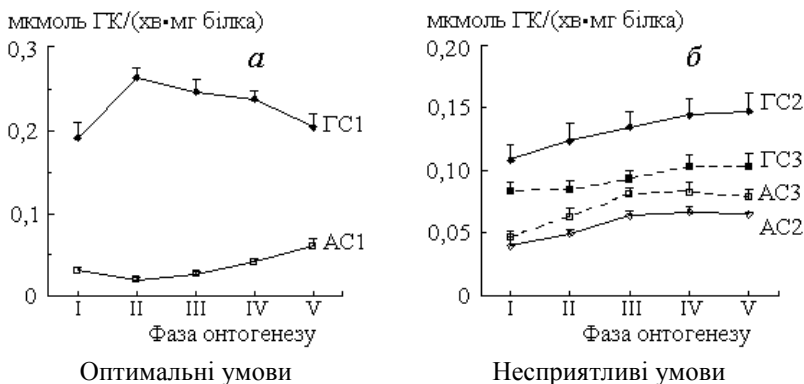
Відбір зразків проводили загальноприйнятими методами [5] у трьох біологічних повторностях. Активність глутамін- та аспарагінсинтази визначали в екстрактах верхніх листків озимої пшениці. Екстракти отримували шляхом гомогенізації листків в охолодженому ( $4\text{ }^{\circ}C$ ) 0,05 М тріс-НCl буфері ( $pH$  7,3), що містив 0,5 мМ цистеїну, 1,0 мМ  $MgSO_4$ , 2,0 мМ ЕДТА. Гомогенат витримували 30 хв на холоді ( $4\text{ }^{\circ}C$ ), центрифугували при 3000 g 5 хв. Активність ферментів в надосадовій рідині визначали за гідроксаматсинтезаною реакцією [7] і розраховували у мкмольх утвореного  $\gamma$ -глутаміл- або  $\beta$ -аспартилгідроксамату за хв на мг білка екстракту тканини. Кількість утворених гідроксаматів визначали за реакцією з розчином хлорного заліза [3, 13], білок – за Лоурі [21].

Вміст сахарози і фруктози визначали у водних безбілкових екстрактах верхніх листків резорциновим методом [6], глюкози – глюкооксидазним методом (аналітичний набір “Діаглюк-2” (Інститут біології клітини НАН України, м. Львів)) і розраховували у мг/г сухої тканини.

Статистичний аналіз результатів досліджень проводили з використанням комп’ютерних програм Excel 7.0. У досліджах використовували реактиви кваліфікації хч або чда фірми “Сінбіас” (Україна).

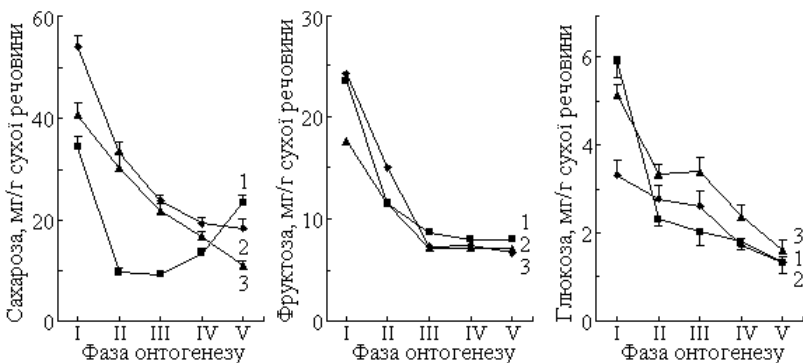
Проведеними дослідженнями встановлено, що активність глутамінсинтази у верхніх листках озимої пшениці за оптимальних умов забезпечення поживними речовинами (вар. 1, достатній вміст основних елементів живлення,  $pH_{KCl}$  – 5,36) досягає максимальних значень у фазах трубкування і колосіння, а протягом завершальних етапів онтогенезу суттєво знижується (рис. 1а). Активність аспарагінсинтази за такого режиму живлення є низькою і змінюється обернено щодо рівня активності глутамінсинтази. Несприятливі умови вегетації озимої пшениці (вар. 2 і 3 – відповідно низький вміст

елементів живлення,  $pH_{KCl}$  4,02 і достатній рівень основних поживних речовин,  $pH_{KCl}$  3,70) супроводжуються зменшенням активності глутамінсинтетази і значним збільшенням активності аспарагінсинтетази в листках. Поряд з тим в онтогенезі рослин відзначено підвищення активності обох ферментів (рис. 1б).



**Рис. 1. Динаміка активності глутамінсинтетази (ГК) і аспарагінсинтетази (АС) у верхніх листках озимої пшениці в онтогенезі за різних умов забезпечення поживними речовинами: I – весняне відростання, II – трубкування, III – колосіння, IV – цвітіння, V – молочна стиглість. ГК –  $\gamma$ -глутамін- або  $\beta$ -аспартилгідроксамат**

Динаміка вмісту цукрів (сахароза, фруктоза, глюкоза) у верхніх листках озимої пшениці в онтогенезі характеризується переважно оберненою спрямованістю порівняно з динамікою активності досліджуваних ферментів (рис. 2). Така зміна вмісту цукрів зумовлена, ймовірно, двома основними факторами – посиленням впливу цукрів з листків у атрагуючі органи у періоди інтенсивного росту і розвитку рослини та зменшенням інтенсивності їх синтезу у листках на кінцевих етапах онтогенезу [4]. Неприятливі умови забезпечення поживними речовинами супроводжуються підвищенням вмісту сахарози та глюкози у листках озимої пшениці у всіх фазах онтогенезу (рис. 2). Рівень фруктози у листках рослин практично не відрізняється між дослідними варіантами.



**Рис. 2. Вміст цукрів у листках озимої пшениці в онтогенезі залежно від умов забезпечення поживними речовинами: 1, 2, 3 - варіанти**

Шляхом зіставлення активності глутамінсинтетази та вмісту сахарози у верхніх листках озимої пшениці виявлено тісні негативні кореляційні зв'язки між цими показниками ( $r = -0,95$ ,  $P < 0,001$ ) за оптимальних умов забезпечення поживними речовинами (табл.). Активність аспарагінсинтетази у листках рослин за таких умов вегетації не залежить від вмісту у них сахарози ( $r = +0,52$ ,  $P > 0,05$ ). Крім того, на активність досліджуваних ферментів не впливає рівень глюкози і фруктози у листках (табл.). За несприятливих умов забезпечення поживними речовинами між активністю глутамін- та аспарагінсинтетази і вмістом цукрів у верхніх листках озимої пшениці виявлено переважно негативні кореляційні зв'язки ( $r = -0,83 \dots -0,99$ ,  $P < 0,001 - 0,05$ ).

Результати наших досліджень засвідчують, що за оптимальних умов забезпечення поживними речовинами сахароза може виступати негативним регулятором активності глутамінсинтетази, проте вона впливає на активність аспарагінсинтетази. Глюкоза і фруктоза не беруть участі у регуляції активності глутамін- та аспарагінсинтетази за таких умов вегетації. За несприятливих умов забезпечення поживними речовинами цукри потенційно можуть функціонувати лише як негативні регулятори активності цих ферментів.

Результати проведених досліджень не узгоджуються з даними ряду авторів [12, 14] про стимуляцію активності глутамінсинтетази за умов інфільтрації цукрами паростків рослин. Разом з тим показано [17], що рівень мРНК та активність глутамінсинтетази у тканинах листків *A. thaliana* суттєво зменшуються за інкубації їх у середовищі з високою концентрацією (більше ніж 3%) сахарози. Крім того,

отримано багато доказів, що активність та синтез аспарагінсинтетази у тканинах рослин суттєво понижуються за дії на них сахарози [8, 11, 22]. Вилучення цукрів із середовища інкубації паростків, навпаки, супроводжувалося підвищенням експресії гена цього ферменту [20].

### **Кореляційна залежність між активністю глутамін- та аспарагінсинтетази і вмістом цукрів у верхніх листках озимої пшениці**

Варіант досліджу, №	Коефіцієнт кореляції, r		
	Сахароза	Глюкоза	Фруктоза
	мг/г сухої речовини		
Активність глутамінсинтетази, мкмоль $\gamma$ -ГГК/хв·мг білка			
1	-0,95, P < 0,001	-0,54, P > 0,05	-0,55, P > 0,05
2	-0,88, P < 0,01	-0,97, P < 0,001	-0,85, P < 0,05
3	-0,84, P < 0,05	-0,83, P < 0,05	-0,62, P > 0,05
Активність аспарагінсинтетази, мкмоль $\beta$ -АГК/хв·мг білка			
1	+0,52, P > 0,05	-0,17, P > 0,05	-0,14, P > 0,05
2	-0,97, P < 0,01	-0,83, P < 0,05	-0,98, P < 0,001
3	-0,92, P < 0,05	-0,84, P < 0,05	-0,99, P < 0,001

Примітка. 1 – оптимальні умови забезпечення поживними речовинами,  $r_{H_{KCl}}$  5,36; 2 і 3 – несприятливі умови (низький вміст елементів живлення,  $r_{H_{KCl}}$  4,02 і достатній рівень основних елементів живлення,  $r_{H_{KCl}}$  3,70).  $\gamma$ -ГГК -  $\gamma$ -глутамілгідроксамат,  $\beta$ -АГК -  $\beta$ -аспартилгідроксамат. P – достовірність коефіцієнта кореляції.

На нашу думку, регуляторна дія цукрів на активність ферментів асиміляції азоту, зокрема глутамін- та аспарагінсинтетази, принаймні частково може виявлятися через репресію-дерепресію генів білків фотосинтетичного апарату [18, 19]. Дослідженнями, які ми провели раніше [1], встановлено, що динаміка вмісту цукрів (сахароза, фруктоза, глюкоза) у верхніх листках озимої пшениці в онтогенезі характеризується оберненою спрямованістю порівняно з динамікою базальної, ADP-стимульованої фотохімічної активності хлоропластів та діафоразної активності ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктази. Методом однофакторного дисперсійного аналізу ми показали [1], що у регуляції фотохімічної активності хлоропластів листків озимої пшениці вагоме місце посідає сахароза. Регуляторний вплив цього дисахариду є досить стабільним і виявляється у рослин за різних умов забезпечення поживними речовинами. Серед двох гексоз (глюкоза, фруктоза) найбільш вірогідною є участь у цій регуляції глюкози. Певною мірою такі результати узгоджуються з даними ряду авторів про наявність у рослин відносно незалежних сахарозо- і

глюкозочутливих механізмів репресії генів фотосинтезу [9, 18, 19]. Вірогідно, що підвищений рівень цукрів у верхніх листках озимої пшениці на початкових (весняне відростання) та кінцевих (цвітіння, молочна стиглість) фазах онтогенезу призводить до зменшення інтенсивності фотосинтетичних процесів. Це в свою чергу супроводжується пониженням активності глутамінсинтетази і підвищенням активності аспарагінсинтетази. Зменшення рівня цукрів у фазах інтенсивного росту та розвитку рослин (трубкування, колосіння), яке зумовлене відтоком їх до атрагуючих центрів [4], супроводжується, очевидно, активацією фотосинтетичних процесів, збільшенням активності глутамінсинтетази і зменшенням активності аспарагінсинтетази. Відомо, що ряд факторів навколишнього середовища, зокрема едафічні, здатні суттєво модифікувати напруженість донорно-акцепторних взаємодій у рослинному організмі [4, 18]. У наших дослідженнях несприятливі умови забезпечення поживними речовинами призводять, вірогідно, до порушення донорно-акцепторних взаємодій у рослинному організмі та підвищення вмісту цукрів у листках рослин на всіх фазах онтогенезу. Це в свою чергу супроводжується зменшенням інтенсивності фотосинтетичних процесів і, отже, значним пониженням активності глутамінсинтетази та адаптивним підвищенням активності аспарагінсинтетази. На нашу думку, вказані процеси відіграють важливу роль у погіршенні параметрів біологічної продуктивності озимої пшениці у варіантах з несприятливими умовами забезпечення поживними речовинами [2].

**Висновки.** За природних умов вегетації озимої пшениці сахароза, фруктоза та глюкоза не здійснюють активуючого впливу на ключові ферменти асиміляції амонійного азоту – глутамінсинтетазу та аспарагінсинтетазу. Цукри швидше за все виступають негативними регуляторами активності цих ферментів.

### Література

1. Дубицький О. Фотохімічна активність хлоропластів листків озимої пшениці за різних умов живлення / О. Дубицький, Г. Габрієль, К. Ткачук // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2007. – Вип. 43. – С. 233 – 240.
2. Дубицький О. Л. Активність глутамін- і аспарагінсинтетази в листках при вирощуванні озимої пшениці в умовах стаціонарного досліді / О. Л. Дубицький, Г. Й. Габрієль, К. С. Ткачук // Фізіол. і біохім. культ. рослин. – 2006. – Т. 38, № 6. – С. 508 – 514.
3. Евстигнеева З. Г. Определение активности глутаминсинтетазы / З. Г. Евстигнеева, Е. А. Громыко, К. Б. Асеева // Приклад. биохим. и микробиол. – 1972. – Т. 8, № 1. – С. 251 – 253.

4. Киризий Д. А. Роль акцепторов ассимилятов в регуляции фотосинтеза и распределения углерода в растении / Д. А. Киризий // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2003. – Т. 35, № 5. – С. 382 – 391.
5. Сирота Ф. Н. Основи аналітичної хімії та сільськогосподарський аналіз / Ф. Н. Сирота. – К. : Вища шк., 1970. – 222 с.
6. Туркина М. В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов / М. В. Туркина, С. В. Соколова // Биохимические методы в физиологии растений / АН СССР, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева. – М. : Наука, 1971. – С. 7 – 34.
7. Elliott W. H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas / W. H. Elliott // J. Biol. Chem. – 1953. – V. 201, № 2. – P. 661 – 672.
8. Herrera-Rodríguez M. B. Light and metabolic regulation of HAS1, HAS1.1 and HAS2, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus* / M. B. Herrera-Rodríguez, J. M. Maldonado, R. Pérez-Vicente // Plant. Physiol. and Biochem. – 2004. – V. 42, № 6. – P. 511 – 518.
9. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression / T. Martin [et al.] // Plant J. – 1997. – V. 11, № 1. – P. 53 – 62.
10. Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase / M. Sahrawy [et al.] // J. Exp. Bot. – 2004. – V. 55, № 408. – P. 2495 – 2503.
11. Lam H. M. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana* / H. M. Lam, M.-H. Hsieh, G. Coruzzi // Plant J. – 1998. – V. 16, № 3. – P. 345 – 353.
12. Light- and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions / K. E. Thum, D. E. Shasha, L. V. Lejay, G. M. Coruzzi // Plant. Physiol. – 2003. – V. 132, № 2. – P. 440 – 452.
13. Lipmann F. A specific micromethod for the determination of acyl phosphates / F. Lipmann, L. C. Tuttle // J. Biol. Chem. – 1945. – V. 159, № 1. – P. 21 – 28.
14. Masclaux-Daubresse C. The two nitrogen mobilization- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites / C. Masclaux-Daubresse, E. Carayol, M. H. Valadier // Planta. – 2005. – V. 221, № 4. – P. 580 – 588.
15. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway / I. C. Oliveira [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2001. – V. 34, № 5. – P. 567 – 575.



16. Miflin B. J. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops / B. J. Miflin, D. Z. Habash // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53, № 370. – P. 979 – 987.
17. Oliveira I. C. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis* / I. C. Oliveira, G. M. Coruzzi // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 121, № 1. – P. 301 – 309.
18. Paul M. J. Sink regulation of photosynthesis / M. J. Paul, C. H. Foyer // *J. Exp. Bot.* – 2001. – V. 52, № 360. – P. 1383 – 1400.
19. Photosynthesis, sugar and the regulation of gene expression / J. V. Pego, A. J. Kortstee, C. Huijser, C. M. Smeeckens // *J. Exp. Bot.* – 2000. – V. 51, № 90001. – P. 407 – 416.
20. Physiological, biochemical and molecular analysis of sugar-starvation responses in tomato roots / C. Devaux [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2003. – V. 54, № 385. – P. 1143 – 1151.
21. Protein measurements with the Folin phenol reagent / J. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265 – 275.
22. Stulen I. Asparagine synthetase in corn roots / I. Stulen, A. Oaks // *Plant Physiol.* – 1977. – V. 60, № 5. – P. 680 – 683.
23. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants / H.-M. Lam [et al.] // *Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 47, № 1. – P. 569 – 593.
24. The rate of CO<sub>2</sub> assimilation controls the expression and activity of glutamine synthetase through sugar formation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves / B. Larios [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55, № 394. – P. 69 – 75.