

УДК 632.95:581.132:581.14:633.853.494

ВЛИЯНИЕ ДИФЕНИЛМОЧЕВИНЫ НА ЭНЕРГОЗАПАСАЮЩИЕ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ РАСТЕНИЙ РАПСА

© 2022 г. Н. П. Татаринцев^{1,*}, Н. С. Захарченко², А. Н. Шмарев³, В. Д. Креславский³, Д. В. Демин³, Г. А. Семенова⁴, А. П. Глинушкин¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии
143050 Московская обл., Одинцовский р-н, пос. Большие Вяземы, ул. Институт, влад. 5, Россия

²Филиал Института биоорганической химии РАН
142290 Пущино, Московская обл., просп. Науки, 6, Россия

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 2, Россия

⁴Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3, Россия

*E-mail: nicktatarintsev@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 27.12.2021 г.

Принята к публикации 15.01.2022 г.

Исследовано влияние N,N¹-дифенилмочевина (ДФМ), обладающей цитокининовой активностью, на фотосинтез, скорость фотофосфорилирования и структуру клеток мезофилла хлоропластов в фазе цветения растений рапса. Обработка растений рапса ДФМ влияла на фотосистему 2 (ФС-2) и изменяла соотношение скоростей циклического (ЦФ) и нециклического фотофосфорилирования (НЦФ) препаратов тилакоидных мембран, выделенных из флагового листа. Через 24 ч после обработки растений ДФМ скорость ЦФ в хлоропластах возрастала на 25–30%, а скорость НЦФ не изменялась. Соотношение скоростей ЦФ и НЦФ сохранялось в течение нескольких суток. Обработка растений ДФМ приводила к повышению максимального квантового выхода ФС-2 ($F_v : F_m$). Полученные результаты свидетельствовали, что обработка растений рапса ДФМ изменяла углеводный обмен в хлоропластах, увеличивая содержание крахмальных зерен в листьях и жира на 20% в зерне конечной продукции.

Ключевые слова: дифенилмочевина, энергозапасующие реакции, фотосинтез, онтогенез растений, рапс.

DOI: 10.31857/S0002188122040135

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов регуляции роста и развития растений является актуальной проблемой физиологии растений [1]. Основную роль в этом процессе играют фитогормоны – индолилуксусная кислота (ИУК) и цитокинины (ЦК), которые синтезируются централизованно: ИУК – в верхушке побега, ЦК – в корнях. Они индуцируют деление клеток и участвуют в регуляции их роста, дифференциации и включают 2 важнейшие генетические программы – побего- и корнеобразование. Эти 2 фитогормона, взаимодействуя по принципу обратных положительных связей, обеспечивают поступательное развитие и старение растительного организма. ИУК индуцирует закладку новых корней, что приводит к увеличению синтеза цитокининов корневой системой. А это, в свою очередь, способствует закладке в

апексе новых метамеров, а при переходе к репродуктивной фазе вегетации – регуляции процесса старения [1–3]. Обработка растений злаков цитокининами в фазе кушения приводит к изменению обмена веществ уже закончивших рост органов. Кинетин, например, задерживает процессы старения и распада. Установлено также влияние ЦК на синтез белков и энергетический обмен как на уровне целого растения, так и хлоропластов в злаковых культурах [2–5]. Ранее было обнаружено влияние природного соединения N,N-дифенилмочевина (ДФМ), обладающего цитокининовой активностью, на скорость циклического (ЦФФ) и нециклического фотофосфорилирования (НФФ) в хлоропластах и пул индолов во флаговых листьях растений пшеницы, обработанных в начале фазы цветения [6]. Нами установлено изменение индукции флуоресценции и реакции хлорофилла на

Таблица 1. Параметры полифазной индукции флуоресценции листьев рапса, рассчитанные из индукционных кривых быстрой флуоресценции хлорофилла

Параметр	Контроль	Контроль + ДФМ*
$F_v : F_m$ – максимальная квантовая эффективность ФС-2	0.735 ± 0.01	0.770 ± 0.01
$ET_0 : RC$ – поток электронов перенесенных от Q_A к Q_B в расчете на реакционный центр ФС-2	0.93 ± 0.02	0.98 ± 0.01
S_v – нормализованная площадь, число восстановленных пластохиноновых переносчиков электрона в ФС-2	32 ± 1	36 ± 1

*ДФМ – дифенилмочевина.

Таблица 2. Влияние обработки растений рапса сорта Галант дифенилмочевинной (ДФМ) в начале фазы цветения на содержание жира в зерне

Показатель	Контроль	ДФМ	НД на метод испытаний
Массовая доля жира, %	31.1 ± 1.0	39.3 ± 1.0	ГОСТ 32905-2012

поражение пшеницы микозами (влияние стресс-факторов) [7, 8]. Однако механизм действия ДФМ на энергетический и углеводный обмен в различных фазах онтогенеза растений во многом остается неясным и является целью настоящего исследования.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Растения рапса сорта Галант выращивали в теплице в сосудах, содержащих 5 кг серой лесной почвы. Использовали стандартные семена рапса от производителя. Семена до посева в почву замачивали на 2 сут в воде (контроль) и в водном растворе ДФМ (10^{-5} М). Перед посевом, готовя почвосмесь для исследования, вносили удобрения: мочевину, двойной суперфосфат, K_2SO_4 в дозах 8 мг/100 г (эквивалентно 20 г/м²) почвы для каждого элемента питания (НРК). Растения обрабатывали раствором ДФМ (0.2 мг/м²) стандартным опрыскиванием из расчета 300 литров рабочего раствора на 1 га в начале фазы цветения. Исследования в теплице проводили в течение 3-х лет. Рас-

тительный материал брали утром в 9–10 ч. Тилакоидные мембраны хлоропластов выделяли из флаговых листьев по методу [9]. Циклическое фотофосфорилирование проводили в присутствии феназинметасульфата (ФМС), нециклическое – в присутствии феррицианида и субстратов, АДФ – 3 мМ, 5 мМ фосфата и 3 мМ хлористого магния в 10 мМ Трицин–NaOH буфере (рН 7.8). Суспензию хлоропластов добавляли в количестве, эквивалентном 30 мкг хлорофилла. Реакционную смесь освещали белым светом с интенсивностью 300 Вт/м² в течение 3 мин. Количество образованного АТФ измеряли биолюминесцентным методом по свечению люциферин-люциферазной системы [10]. Структуру хлоропластов в фазе молочно-восковой спелости исследовали с помощью электронной микроскопии [11]. Для этой цели аликвоту суспензии хлоропластов фиксировали с 2.5%-ным глутаровым альдегидом в фосфатном буфере (рН 7.4) с последующей фиксацией в 1%-ном растворе OsO_4 . Фиксированные образцы обезвоживали в спирте и ацетоне и заполняли эпоном 812. Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца.

Измерение флуоресценции хлорофилла. Активность ФС-2 оценивали путем измерения флуоресценции хлорофилла с помощью метода быстрой флуоресценции (БФл). Перед измерениями листья закрепляли внутри измерительной ячейки и держали в темноте 15 мин.

Различные флуоресцентные параметры, такие как F_0 , F_v и F_m , где F_0 – начальная (минимальная) флуоресценция, F_m – максимальная флуоресценция, F_v – переменная ($F_v = F_m - F_0$), определяли с помощью ПАМ флуориметра (ХЕ-РАМ, Heinz Walz, Германия). Индукционные кривые БФл (OJIP-transient) были оценены в электронном виде и записаны на компьютере [12]. Оценивали максимальную квантовую эффективность ФС-2 по величине соотношения $F_v : F_m$. На основе индукционных кривых БФл рассчитывали также величину $ET_0 : RC$ – поток электронов, перенесенных от Q_A на Q_B в расчете на РЦ ФС-2 и S_0 – нормализованную площадь, число восстановленных пластохиноновых переносчиков электронов в ФС-2 (табл. 1).

Опыт проводили в 3-х повторностях, аналитические измерения – в 5-ти повторениях. Представлены среднеарифметические величины типичного опыта и их стандартные отклонения. Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0.05$.

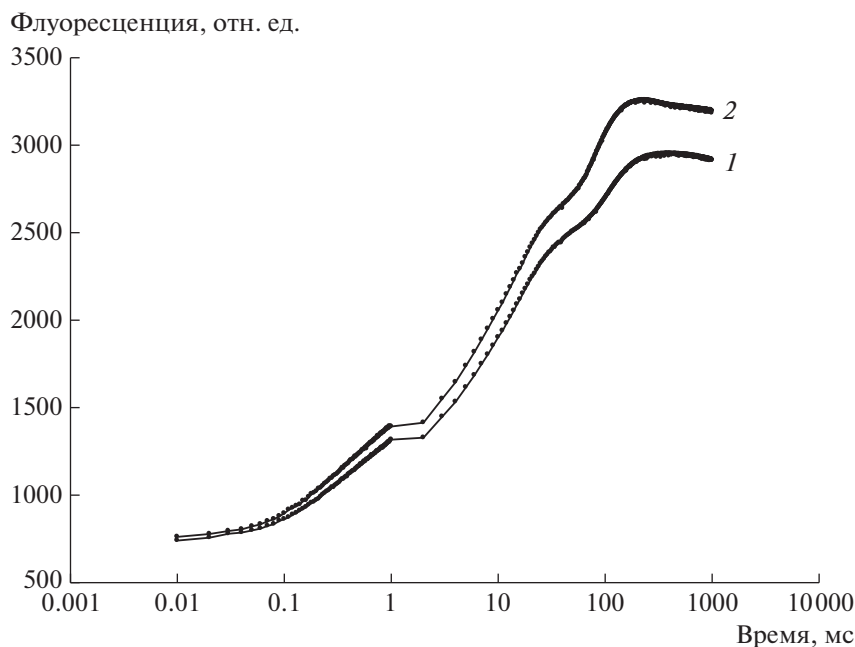


Рис. 1. Индукционные кривые быстрой флуоресценции Хл *a* в листьях контрольных и обработанных дифенилмочевинной (ДФМ) растений рапса в начале фазы цветения: 1 – контроль, 2 – ДФМ; время – миллисекунды (мс).

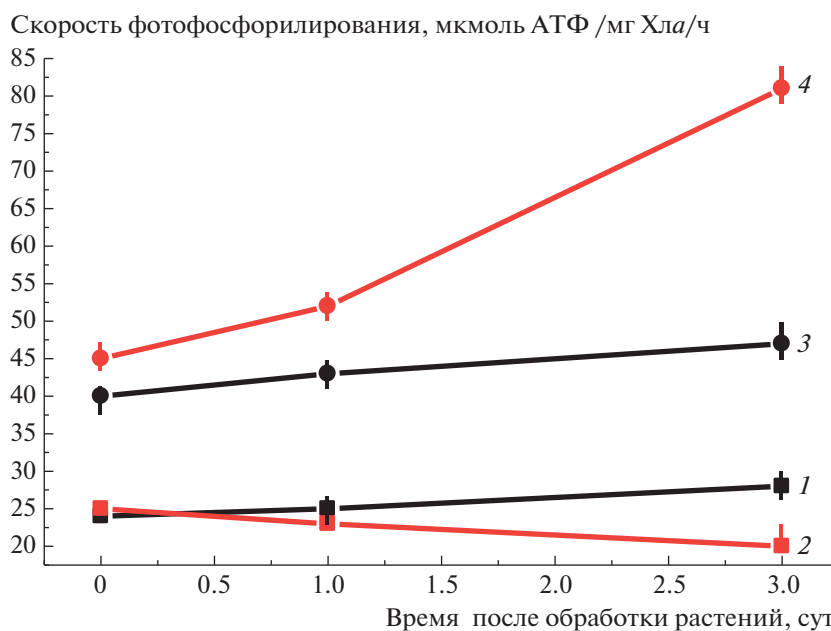


Рис. 2. Влияние обработки растений рапса сорта Галант дифенилмочевинной (ДФМ) в начале фазы цветения на скорости циклического (ЦФ) и нециклического (НЦФ) фотофосфорилирования в препаратах тилакондных мембран хлоропластов: 1 – контроль – скорость НЦФ, 2 – обработка ДФМ – скорость НЦФ через 1 и 3 сут, 3 – контроль – скорость ЦФ, 4 – обработка ДФМ – скорость ЦФ через 1 и 3 сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было исследовано действие ДФМ на фотосинтетическую активность ФС-2. Типичные кривые быстрой флуоресценции представлены на рис. 1. Индукционная кривая растений обработанных

ДФМ, располагается выше контроля и площадь под ней, отражающая емкость пластохинонового пула, больше, чем площадь под индукционной кривой контроля. Из чего следует, что число молекул пластохинона – переносчика электрона в ЭТЦ ФС-2 было больше у растений, обработан-

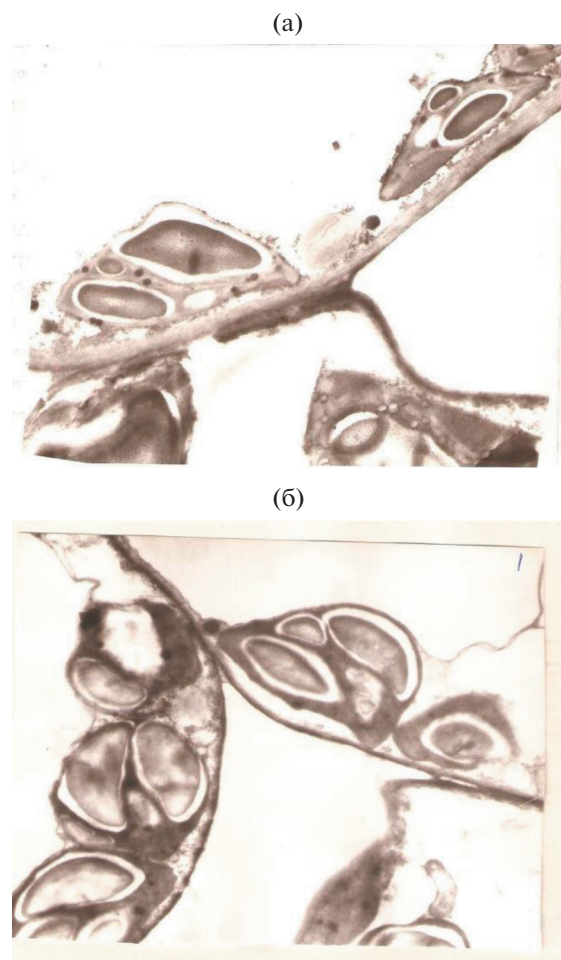


Рис. 3. Электронная микроскопия меристемных клеток флаговых листьев (крахмальные зерна) растений рапса сорта Галант, выделенных в фазе начала молочной спелости: (а) – контроль, (б) – растения, обработанные ДФМ в начале фазы цветения.

ных ДФМ, чем в контроле. Также, в результате обработки растений ДФМ увеличивались величины ряда параметров флуоресценции $Xl a$, в том числе максимальный квантовый выход $ФС-2 (Fv : Fm)$, максимальный поток электронов, перенесенных от первичного стабильного акцептора в фотосистеме 2 QA к вторичному акцептору QB , в расчете на реакционный центр $ФС-2 (ET_0 : RC)$ (табл. 1). Известно, что фотосинтетический аппарат ($ФА$) (особенно $ФС-2$) является одной из наиболее чувствительных систем к воздействию стрессов различной природы [13, 14]. Полученные данные согласуются с ранее полученными данными в работе [15], где было показано, что ДФМ замедляла старение и снижала степень окислительного стресса в листьях. Таким образом, на уровне первичных процессов фотосинтеза проявлялся стабилизирующий эти процессы эффект ДФМ.

Уже на 2-е сут после обработки растений ДФМ, проведенной в начале фазы цветения растений рапса, наблюдали увеличение скорости циклического фотофосфорилирования, а скорость нециклического фотофосфорилирования изменялась незначительно (рис. 2). При этом максимальная разница между опытом и контролем достигалась к середине фазы цветения. Согласно нашим данным, полученным на проростках пшеницы по влиянию умеренного теплового стресса на фотохимическую активность и скорость фотофосфорилирования [12], такая разница между циклическим и нециклическим фотофосфорилированием может объясняться проявлением умеренного окислительного стресса ($ОС$), индуцированного стрессором. За счет развития $ОС$ усиливается $ЦФФ$ и снижается $НФФ$. Предположили, что обработка ДФМ аналогично индуцирует развитие слабого окислительного стресса во флаговом листе, что приводит к усилению циклического фотофосфорилирования. В работе [15] было установлено, что обработка злаковых растений в начале фазы цветения приводит к изменению структуры хлоропластов, увеличению скорости циклического фотофосфорилирования и соотношения некоторых аминокислот в зерне и их содержания. В частности, наблюдали увеличение содержания пролина в обработанных злаковых растениях. Считается, что пролин является маркером развития стресса в растениях [16]. При этом, как показано ранее в работах [5, 6], изменяется содержание индолов и фенолов в листьях злаков и, соответственно, соотношение цитокининов и ауксинов. Обработка растений ячменя в начале фазы цветения, когда формируется колос (активен флаговый лист), приводит к увеличению урожайности и снижению содержания запасного белка (что подтверждено эффектом разбавления: крахмальные составляющие нарабатываются быстрее, белковость зерна ячменя снижается). Имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что после обработки злаковых растений цитокининами в фазе колошения отмечено увеличение количества зерен в колосе и урожайности растений [17], это можно объяснить большей выполненностью зерен в колосе и колосках злаков, особенно многорядного ячменя, пшеницы и овса по сравнению с карбамидно-аммиачной смесью [18–20]. На основе полученных результатов и литературных данных [21, 22] можно сделать предположение, что обработка растений ДФМ изменяет скорость поступления метаболитов углеводного и белкового обмена в репродуктивные органы рапса и их накопление за вегетационный период. Обработка вегетирующих рас-

тений ДФМ энергетически и экономически менее затратная по сравнению с применением КАС 28. ДФМ перспективен для изучения и на других культурах, в том числе по физиолого-экономическим основаниям.

Полученные нами результаты по структуре хлоропластов, выделенных в фазе начала молочной спелости (электронная микроскопия) свидетельствовали о том, что обработка семян и растений рапса ДФМ в начале фазы цветения изменяла углеводный обмен в хлоропластах, увеличивая содержание крахмальных зерен (рис. 3). Результаты анализа содержания жира в семенах контрольных и обработанных ДФМ растений рапса (табл. 2), свидетельствовали о существенном увеличении содержания жира (до 26.3%) в сформированных семенах рапса при опрыскивании растений.

ВЫВОДЫ

1. Обработка растений ДФМ приводила к повышению максимального квантового выхода ФС-2 ($F_v : F_m$) и изменяла соотношение скоростей циклического (ЦФ) и нециклического (НЦФ) фотофосфорилирования препаратов тилакоидных мембран.

2. Обработка растений рапса ДФМ изменяла углеводный обмен в хлоропластах, увеличивая содержание крахмальных зерен в листьях и жира на 20% в зерне конечной продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерфлинг К. Гормоны растений. М.: Мир, 1985. 298 с.
2. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функции. М. Наука, 1973. 263 с.
3. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 4. С. 626–640.
4. Якушкина Н.И., Похлебаев С.М. Особенности фотофосфорилирования хлоропластов, выделенных из обработанных фитогормонами листьев ячменя и пшеницы // Физиология растений. 1982. Т. 29. № 3. С. 502–507.
5. Татаринцев Н.П., Лебедева А.И., Пачепская Л.Б., Рузиева Р.Х., Герц С.М., Руденко Т.И. Взаимосвязь различных типов фотофосфорилирования и пулов метаболитов индольной и фенольной природы в онтогенезе злаковых культур // Физиология растений. 1993. Т. 41. № 5. С. 709–714.
6. Tatarintsev N.P. Low-frequency cyclic variations in the energy-storing reactions of photosynthesis and indole pool size in wheat plant during ontogeny // Biophysics. 2002. V. 47. P. 78–81.
7. Тимофеев Н.П., Маторин Д.Н., Глинушкин А.П., Горячев С.Н., Алексеев А.А. Индукция флуоресценции хлорофилла у зараженной корневой гнилью озимой пшеницы // Естеств. и техн. науки. 2017. Т. 3. № 105. С. 17–19.
8. Маторин Д.Н., Тимофеев Н.П., Глинушкин А.П., Братковская Л.Б., Заядан Б.К. Исследование влияния грибковой инфекции *Bipolaris sorokiniana* на световые реакции фотосинтеза пшеницы с использованием флуоресцентного метода // Вестн. МГУ. Сер. 16: Биология. 2018. Т. 73. № 4. С. 247–253.
9. Opanasenko V.K., Agafonov A.V., Demidova R.N. Effects of heterocyclic and tertiary permeant amines on the electron transfer in thylakoid membranes // Photosynth. Res. 2002. V. 72. P. 242–253.
10. Schmidt G., Graber P. The rate of ATP synthesis by reconstituted CF_0F_1 liposomes // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 808. С. 46–51.
11. Semenova G.A. Structural reorganization of thylakoid systems in response to heat treatment // Photosynthetica. 2004. V. 42. P. 521–527.
12. Kreslavski V., Tatarinzev N., Shabnova N., Semenova G., Kosobrukhhov A. Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-time dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 1592–1600.
13. Barber J., Andersson B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis // Trend. Biochem. Sci. 1992. V. 17. P. 61–66.
14. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis // Photosynth. Res. 2008. V. 98 P. 541–550.
15. Татаринцев Н.П., Семенова Г.А., Креславский В.Д. Фотофосфорилирование, структура хлоропластов и аминокислотный состав запасного белка в зерне ячменя и пшеницы под влиянием N,N-дифенилмочевины // Сел.-хоз. биол. 2013. Т. 3. С. 66–71.
16. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. № 46. С. 391–336.
17. Caers M., Vendrig I.C. Benzyladenine effects on the development of the photosynthetic apparatus in *Zea mays* // Physiol. Plant. 1986. V. 66. P. 686–691.
18. Спиридонов Ю.Я., Соколов М.С., Глинушкин А.П., Каракотов С.Д., Коришунов А.В., Торопова Е.Ю., Сараев П.В., Семенов А.М., Семенов В.М., Никитин Н.В., Калиниченко В.П., Лысенко Ю.Н. Адаптивно-интегрированная защита растений. М., 2019. 628 с.
19. Торопова Е.Ю., Глинушкин А.П., Селюк М.П., Казакова О.А., Овсянкина А.В. Развитие почвенных инфекций у яровой пшеницы и ячменя под влиянием гидротермических стрессов в условиях лесостепи Западной Сибири и Зауралья // Рос. сел.-хоз. наука. 2018. № 2. С. 25–29.
20. Тулякова М.В., Баталова Г.А., Пермьякова С.В., Градобоева Т.П. Результаты изучения перспективных линий овса конкурсного сортоиспытания в условиях Кировской области // Вестн. Марий. Гос. ун-та. Сер.: Сел.-хоз. науки. Эконом. науки. 2020. Т. 6. № 3 (23). С. 325–333.

21. *Пишбытко Н.Л., Бачище Т.С., Кабашикова Л.Ф.* Влияние повышенной температуры на перенос электронов в хлоропластах ячменя // Изв. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. науки. 2020. Т. 65. № 2. С. 153–162.
22. *Агаев Р.А.О., Беспалова Л.А., Агаева Е.В.* Посевные и урожайные свойства семян пшеницы мягкой озимой в зависимости от зоны репродукции // Политемат. сетев. электр. научн. журн. Кубан. ГАУ. 2020. № 157. С. 312–323.

Effect of Diphenylurea on Energy-Storing Reactions of Photosynthesis in Ontogenesis of Rape Plants

**N. P. Tatarintsev^{a,#}, N. S. Zakharchenko^b, A. N. Shmarev^c, V. D. Kreslavsky^c,
D. V. Demin^c, G. A. Semenova^d, and A. P. Glinushkin^a**

^aAll-Russian Research Institute of Phytopathology
ul. Institute, vlad. 5, Moscow region, Odintsovo district, r.p. Bolshye Vyazemy 143050, Russia

^bBranch of the Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS
prosp. Sciences 6, Moscow region, Pushchino 142290, Russia

^cInstitute of Fundamental Problems of Biology of the RAS
ul. Institutskaya 2, Moscow region, Pushchino 142290, Russia

^dInstitute of Theoretical and Experimental Biophysics of the RAS
ul. Institutskaya 3, Moscow region, Pushchino 142290, Russia

[#]E-mail: nicktatarintsev@yandex.ru

The effect of N,N-diphenylurea (DPU), which has cytokinin activity, on photosynthesis, photophosphorylation rate, and the structure of chloroplast mesophyll cells in the flowering phase of rape plants was studied. The treatment of rapeseed plants with DPU influenced photosystem 2 (PS-2) and changed the ratio of the rates of cyclic (CPP) and non-cyclic photophosphorylation (NCPP) of preparations of thylakoid membranes isolated from the flag leaf. Through 24 h after the treatment of plants with DPU, the rate of CPP in chloroplasts increased by 25–30%, while the rate of NCPP did not change. The ratio of the rates of the CPP and NCPP was maintained for several days. The treatment of plants with DPU led to an increase in the maximum quantum yield of PS-2 ($F_v : F_m$). The results obtained indicate that the treatment of rapeseed plants with DPU changes the carbohydrate metabolism in chloroplasts, increasing the content of starch grains in the leaves and fat by 20% in the grain of the final product.

Key words: diphenylurea, energy-saving reactions, photosynthesis, plant ontogenesis, rapeseed.