

УДК 581.1:633.358

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ В УСИЛЕНИИ ЭЛЮЦИИ ЭЛЕКТРОЛИТОВ ИЗ СЕМЯН ГОРОХА, ПОДВЕРГНУТЫХ УСКОРЕННОМУ СТАРЕНИЮ

Д. А. ЗАХАРИН, О. С. ЖАДОВА, Л.Л. ПАНИЧКИН

(Лаборатория биофизики растений
и гидрофобизации семян)

Для исследования влияния возраста (срока хранения) семян на их физиологические свойства использовали модель ускоренного старения. На 13 сортах и линиях гороха показано многократное увеличение элюции электролитов из семян, подвергнутых процедуре ускоренного старения. При этом генотипическая варибельность феномена достигала 10 крат, т. е. количественные различия между сортами были значительные. Обсуждаются механизмы ускоренного старения семян и проблемы экспресс-гестирования устойчивости растений.

В сравнении с прямыми диагностическими методами экспресс-тестирование растений позволяет сократить затраты времени и труда, что может представлять интерес для селекции. При этом чем меньше собственный возраст объекта, чем более молодые проростки используются для экспресс-тестирования, тем

затраты меньше. В этом отношении наибольший интерес могут представлять семена как объект тестирования растений [2]. В частности, исследовали выход электролитов из семян в процессе их набухания [3].

Своеобразие семян как объекта экспресс-тестирования состоит в очень большом

Работа выполнена при поддержке РФФИ. Проект № 99-04-49437.

структурном и временном разрыве между параметрами семян и свойствами выросших из них растений (проходящих последовательно все этапы онтогенеза). Особенности семян как объекта, мало чувствительного к внешним условиям и предназначенного природой именно для переживания стрессовых неблагоприятных условий, делает использование их как тест-объекта, на первый взгляд, проблематичным. Однако это относится к сухим семенам. Уже на ранних этапах процесса набухания чувствительность семян к влажности, температуре и другим внешним факторам резко возрастает. На этом основан, в частности, метод ускоренного старения семян [6]. В работе [3] была описана оригинальная методика, при помощи которой исследовали кинетику выхода электролитов из семян. Апробация на 13 сортах и линиях гороха показала высокую разрешающую способность метода, позволяющего надежно различать сорта. Критерием применимости этого и других методов на семенах для экспресс-тестирования растений являются их выравнивание, снижение разнокачественности, связанной с условиями хранения семян разных генотипов [4].

Одним из трудно устранимых факторов разнокачественности семян можно считать их возраст, т. е. срок хранения [1]. Практика использования семян для оценки свойств растений имеет и ряд достоинств: простота хранения, возможность использовать в любой момент, отсутствие дополнительных процедур как источника дополнительных ошибок, стабильность свойств. В то же время недостаточно исследованы факторы, способные влиять на свойства семян в процессе хранения, а также длительность хранения. Влияние возраста семян можно исследовать прямым способом, если брать семена из урожаев разных лет. Однако здесь возможна методическая погрешность, обусловленная разностью погодных условий разных лет, а также вероятностью различий в происхождении (географическом) и условиях хранения семян. Идеально было бы использовать одну партию семян одного года урожая, но тогда эксперимент растянется на несколько лет, а сведение воедино полученных в разные годы данных тоже довольно проблематично. Поэтому, как первый подход к решению проблемы, был использован метод ускоренного старения семян.

Задача настоящей работы — на значительном массиве генотипов исследовать сортовые особенности ускоренного старения семян, тестируя их по выходу электролитов: однотипны ли изменения скорости выхода электролитов у разных сортов при старении семян и каковы закономерности этих изменений. От этого будет зависеть, допустимо ли для оценки физиологических свойств генотипов растений использование разновозрастных и старых семян. О влиянии возраста на свойства семян судили косвенно, используя метод ускоренного старения семян, который можно рассматривать лишь как более или менее условную модель естественного процесса.

Методика

В качестве объектов исследований использовали семена 13 сортов и линий гороха (Ульяновский, Немчиновский 766, Немчиновский 65, Уладовский 8, Аграрий, Красноуфимский, Пионер, Дамбар, Сармат, Рамонский, Орловчанин, Скороспелый 180, Фитотрон). Семена хранили в лаборатории при комнатных температуре и влажности воздуха.

На нормально хранящихся (контроль) и на искусственно состаренных (опыт) семенах

изучали динамику выхода электролитов, как это было описано ранее [3]. Для этого семена гороха помещали в сосудик объемом 5 мл, где они непрерывно орошались проточной дистиллированной водой. При помощи графитовых электродов измеряли электропроводность вытекающего раствора, которая была функцией количества ионов, выделяемых семенами в проточную дистиллированную воду. Регистрация электропроводности раствора на самопишущем микроамперметре давала возможность фиксировать кинетику процесса элюции семян.

Использовали метод ускоренного старения семян [6], состоящий в одновременном наложении на сухие семена двух факторов: 100% влажности воздуха и температуры 40°C. С этой целью семена помещали в эксикатор с водой так, чтобы они не контактировали с жидкостью, но находились в атмосфере насыщенных паров воды. Эксикатор помещали в термостат в большинстве случаев на сутки, хотя иногда применяли также большие или меньшие экспозиции. В качестве контроля использовали семена, хранящиеся при нормальной температуре и влажности (сухой контроль), или семена, помещенные в эксикатор со 100% влаж-

ностью воздуха, но при комнатной температуре (влажный контроль). Повторность в экспериментах была 6-12-кратная.

Результаты

Кинетика выхода электролитов из семян записывалась на ленте самописца в виде характерной кривой, при этом измеряли 2 основных параметра: I и t . I — значение силы тока в мкА, соответствующее точке максимума кривой элюции семян. Оно прямо пропорционально электропроводности вытекающего раствора, а величина электропроводности, в свою очередь, тесно связана с концентрацией ионов в растворе на выходе; t — время достижения максимума в часах.

Концентрация ионов в вытекающем растворе характеризует скорость выхода ионов из объекта, то, что нас непосредственно интересует. На самописце регистрируется не выход ионов из семян (нарастающим итогом), т. е. не интегральная зависимость, а сразу первая производная — скорость выхода ионов из объекта, правда, в относительных единицах (мкА). Теоретически в 0 времени выделение ионов равно нулю. По мере того, как вода смачивает сухое семя и проникает последовательно во все более глубокие структуры,

начинается выделение ионов и постепенно возрастает до максимума. Реально наблюдали несколько иную картину вследствие того, что в первые 5-15 мин шла отмывка поверхности семени.

Данные табл. 1, во-первых, дают представление о кинетике ускоренного старения семян сорта Ульяновский по основному показателю — всхожести семян. Уже через 3 ч было зарегистрировано снижение всхожести, однако достоверным оно становится при больших экспозициях. Двое суток ускоренного старения (или больше) приводило к полной потере всхожести. Во-вторых, в табл. 1 представлены количественные параметры элюции: I и t . Видно, что в течение первых суток ускоренного старения максимальная сила тока возрастала, а время достижения максимума непрерывно снижалось, однако кинетика этих процессов была не монотонной. В методической части работы использовали 2 контроля, сухой и влажный. Первый соответствовал стандартной схеме работы экспресс-тестирования растений по семенам, как это было описано [3]. Второй (влажный) контроль был интересен для понимания механизма действия самой процедуры ускоренного старения. Все данные статистически обработаны.

Т а б л и ц а 1

Кинетика процесса элиции семян гороха сорта Ульяновский

Вариант	Всхожесть, %	Параметры максимума выхода электролитов из семян	
		I, мкА	t, ч
Контроль сухой	90	1,01±0,10	3,85±0,17
Контроль влажный:			
24 ч	100	1,01±0,12	1,61±0,09
48 ч	98	1,40 ±0,12	0,82±0,07
После ускоренного старения:			
3 ч	87	1,60±0,09	1,35±0,10
6 ч	73	1,57±0,14	0,38±0,05
12 ч	55	5,02±0,21	0,71±0,08
24 ч	50	4,95±0,23	0,68±0,06
48 ч	0	4,50±0,19	0,56±0,03

Т а б л и ц а 2

Некоторые характеристики процесса элиции электролитов из семян различных сортов гороха, хранившихся в нормальных условиях (контроль) и предварительно подвергнутых процедуре ускоренного старения (опыт)

Сорт	Контроль		Опыт	
	I, мкА	t, ч	I, мкА	t, ч
Сармат	0,97±0,08	4,39±0,52	1,22±0,14	0,60±0,07
Ульяновский 7	1,01±0,10	3,85±0,17	2,54±0,30	0,62±0,10
Немчиновский 766	1,07±0,10	3,78±0,41	3,47±0,24	1,40±0,12
Рамонский 76	1,31±0,10	3,85±0,35	4,80±0,42	1,05±0,08
Немчиновский 65	1,34±0,23	1,95±0,23	3,80±0,29	0,39±0,07
Красноуфимский	1,47±0,19	1,74±0,23	5,88±0,40	0,29±0,03
Дамбар	1,37±0,15	1,57±0,19	3,67±0,42	0,48±0,12
Скороспелый 180	1,44±0,16	1,62±0,21	1,85±0,21	0,23±0,03
Уладовский 8	1,54±0,11	1,72±0,19	2,22±0,19	0,28±0,07
Фитотрон	1,81±0,13	1,60±0,16	3,45±0,31	0,25±0,09
Пионер	1,45±0,13	1,17±0,18	2,20±0,18	0,62±0,09
Орловчанин	1,94±0,14	1,27±0,19	3,84±0,25	0,45±0,06
Аграрий	1,85±0,13	1,10±0,09	5,53±0,19	0,36±0,01
Сумма	20,39	32,21	47,12	7,67
Среднее	1,46	2,30	3,37	0,55

В табл. 2 представлены основные параметры, I и t, для контрольных и ускоренно со-

старенных семян 13 генотипов гороха. Видно, что у семян, подвергшихся стрессу

(процедуре ускоренного старения), во всех без исключения случаях были более высокие значения I и более низкие значения t . Это означает, что кривые элюции семян в этом случае скорее достигают максимума и сам максимум больше по абсолютным значениям, что свидетельствует о резком увеличении выхода ионов, обусловленном значительным снижением ионоудерживающей способности состаренных семян. Эти изменения выражены по-разному у разных сортов. Данные таблицы позволяют оценить вариабельность этих различий, а приведенные в нижней графе средние зна-

чения показывают увеличение I в 2 раза и снижение t примерно в 4 раза при переходе от контроля к опыту.

Результаты простейшего математического анализа экспериментальных данных приводятся в табл. 3. Рассчитанные значения кратности увеличения I и кратности снижения t характеризуют большое генотипическое разнообразие этих показателей, а в среднем они составляют соответственно 2,34 и 4,67 (колонки 1 и 2). Произведение этих величин, равное 11,39, позволяет оценить масштаб возрастания элюции электролитов из семян, подвергнутых процедуре ускоренного

Т а б л и ц а 3

Некоторые производные показатели выхода электролитов из семян гороха, контрольных (к) и искусственно состаренных (о).

По данным табл. 2

Сорт	I_o/I_k 1	t_o/t_k 2	I_k/t_k 3	I_o/t_o 4	$(I_o t_k):(t_o I_k)$ 5
Сармат	1,26	7,32	0,22	2,03	9,26
Ульяновский 7	2,51	6,21	0,26	4,10	15,81
Немчиновский 766	3,24	2,70	0,28	2,48	8,85
Рамонский 76	3,66	3,67	0,34	4,57	13,42
Немчиновский 65	2,84	5,00	0,69	9,74	14,12
Красноуфимский	4,00	6,00	0,84	20,28	24,15
Дамбар	2,68	3,27	0,87	7,64	8,80
Скороспелый 180	1,28	7,04	0,89	8,06	9,06
Уладовский 8	1,44	6,14	0,90	7,93	8,84
Фитотрон	1,91	6,40	1,13	13,80	12,23
Пионер	1,52	1,89	1,24	3,55	2,86
Орловчанин	1,98	2,82	1,53	8,54	5,58
Аграрий	2,99	3,06	1,68	15,36	9,16
Сумма	32,77	65,40	11,56	112,06	147,79
Среднее	2,34	4,67	0,82	8,29	10,31

старения в течение суток. Рассчитаны величины коэффициентов $1/t$ для контроля и опыта, а также отношения этих величин для всех генотипов (колонки 3-5).

Обсуждение

При сравнении сортов нам не удалось выполнить идеальные требования: семена были разного происхождения и возраста. Соблюдения идентичности всех условий при получении и хранении испытуемых семян растений нескольких генотипов достичь довольно трудно. Впрочем, наличие контролей для всех вариантов в некоторой степени снимало эту погрешность. Семена отбирали по внешнему виду и размеру, а усредненная проба состояла из 5 семян гороха (1 образец). Сам факт, что «старение» семян вызывает снижение их ионоудерживающей способности и увеличение выхода ионов в окружающую среду, не является абсолютно новым. Но обычно это наблюдали на весьма ограниченном материале, максимум на 2—3 видах или сортах растений. В нашем случае анализировали сравнительно большой набор сортов, и это дало возможность по-новому взглянуть на сам процесс старения. Стало очевидно, что даже семена растений одного вида, но раз-

ных сортов «старелись» не одновременно. Кинетика элюции ионов у разных сортов изменялась неодинаково под влиянием стрессового воздействия, наблюдалась асинхронность процессов. Так, у сорта Сармат при нормальных условиях хранения максимум выхода ионов достигался через 4,39 ч, после стрессового воздействия — через 0,60 ч, а у сорта Немчиновский 766 — соответственно через 3,78 и 1,40 ч.

Из данных работы можно сделать 2 вывода: 1) кинетика элюции семян является сортоспецифическим признаком; 2) эта кинетика радикально изменяется в процессе искусственного старения семян, причем всегда в сторону увеличения элюции, но масштабы этих изменений неодинаковы для различных образцов. Первый вывод подтверждает данные более ранних работ. Второй, связанный с основным вопросом работы, можно ли тестировать физиологические свойства растений (например, устойчивость к стрессам) на семенах разного срока хранения, приводит к отрицательному ответу на вопрос.

Известно, что проницаемость растительных объектов для воды многократно (до 10 крат) выше, чем для минеральных ионов. Однако увеличение или уменьшение

проницаемости для ионов свидетельствует об одновременном однонаправленном изменении проницаемости для воды. Повреждение семени при ускоренном старении, по-видимому, вызывает и значительное повышение проницаемости его для воды. Таким образом, происходит нарушение нормального, регулируемого набухания, которое является необходимым первым этапом прорастания семян. При этом начальное набухание семян при процедуре ускоренного старения (в отсутствие воды в жидкой фазе) происходит замедленно, а конечная влажность семян не достигает тех значений, которые наблюдаются при контакте семени с жидкой водой и которые необходимы для нормального прорастания.

Метод ускоренного старения, конечно, является лишь несовершенной моделью естественного старения семян в процессе хранения. Но возрастание проницаемости структур семени для воды и ионов, свидетельствующее о повреждении, а также снижение всхожести семян дают основание говорить о некотором подобии модели и естественного старения. Сама процедура ускоренного старения, на первый взгляд, представляется очень мягкой и вызываемые ею большие следст-

вия могут вызвать удивление. Действительно, ни 40°C, ни 100% влажность воздуха по отдельности не способны оказать на семена сильного стрессового воздействия. Но наложение одновременно двух, хотя и слабых, стрессов, в частности, сочетание стрессов температурного и водного, производят серьезные изменения и нарушения водно-солевого обмена и других физиологических процессов, вплоть до полной гибели семян. По-видимому, в этом случае не достигается уровень критической влажности, которая для гороха составляет около 50% сырой массы [5].

Как видно из табл. 1, влажные контроли вызывали изменения процесса элюции семян в том же направлении, что и процедура ускоренного старения, но значительно слабее. Через сутки действия влажного контроля эти изменения были меньше, чем через 3 ч ускоренного старения, а двое суток влажного контроля увеличивали проницаемость семян для ионов слабее, чем 6 ч ускоренного старения. Замечательно, что всхожесть семян влажного контроля не снижалась, как при ускоренном старении, а даже несколько возрастала.

Из контролируемых параметров наиболее чувствительным тестом при ускоренном старении семян являются

ся t (время достижения максимума), затем I (максимальная скорость выхода ионов из объекта) и последним — всхожесть, которая стремится сохраниться даже в интенсивно разрушаемом семени. Особый интерес представляет вторая производная, I/t , отражающая кинетику элюции семян. Если первая производная (I) является функцией скорости выхода электролитов из объекта, то вторая характеризует крутизну нарастания тока. Величина I/t может служить тестом ионоудерживающей способности семени как цельного образования. По-видимому, она складывается из адсорбции ионов макромолекулами, а также из барьерной функции мембран и семенных оболочек. Происходящая в ходе ускоренного старения деструкция семени снижает его ионоудерживающую способность, примерно, на порядок, однако при этом значительная часть семян (около 50%) еще сохраняет свое фундаментальное свойство — способность прорасти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочваров П. З., Николаева А. К., Алехина И. Д., Андреевко С. С. Оценка жизнеспособности семян сои при естественном старении. — Биол. науки, 1983, № 6, с. 73-78. — 2. Захарин А. А., Паничкин Л. А. Физиологические основы ранней диагностики устойчивости растений. — Тез. докл. второго съезда Всероссийского общества физиологов растений. М.: 1992, ч. 2, с. 78. — 3. Захарин А. А., Паничкин Л. А., Жадова О. С. Кинетика выхода электролитов из прорастающих семян гороха различных сортов. — Изв. ТСХА, 1992, вып. 1, с. 182-185. — 4. Кизилова Е. Г. Разнокачественность семян и ее агрономическое значение. — Киев: Урожай, 1974. — 5. Николаева М. Г., Лянгузова И. В., Поздова Л. М. Биология семян. С-Пб.: 1999. — 6. Delouche J. C., Baskin C. C. Seed Sci. a Technol., 1973, vol. 1, p. 427—452.

*Статья поступила
24 ноября 2000 г.*