

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ, УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

В.В. РОГОЖИН, В.В. ВЕРХОТУРОВ, Т.Т. КУРИЛЮК, Е.П. ОХЛОПКОВА

(Якутская государственная с.-х. академия)

Изучали динамику активности пероксидазы и содержание антиоксидантов (АО) в семенах пшеницы в течение 24 ч набухания при 5° С (I группа) и 23° С (II группа). Активность пероксидазы и содержание АО в зародыше у семян I группы было в 1,5 раза выше. У этих же семян в процессе набухания была выше активность пероксидазы в эндосперме и коже соответственно в 1,5 и 1,8 раза. Приводятся величины каталитических констант пероксидазы зерен пшеницы в реакциях пероксидазного окисления о-дианизидина и аскорбиновой кислоты. Показано, что K_m мало изменяется в исследованном диапазоне pH 5—7. Установлено, что в проростках пшеницы повышение уровня антиоксидантов сопровождается увеличением перекисного окисления липидов (ПОЛ), а активность пероксидазы возрастает с уменьшением содержания антиоксидантов. В случае повышения уровня антиоксидантов отмечается понижение активности пероксидазы. Изучено влияние антиоксидантов на всхожесть семян пшеницы. Показано, что малые концентрации используемых веществ повышают всхожесть семян, тогда как высокие понижают их всхожесть, что проявляется в своеобразной динамике. Высказаны рекомендации по использованию изученных соединений для повышения посевных качеств семян пшеницы.

Предполагается, что ведущими в механизме термоадаптации являются системы внутриклеточной регуляции, прежде всего генетическая и энзиматическая, функциональная лабильность которых обусловлена их полиморфизмом. Реакция организма на воздействие низкой температуры зависит от силы и продолжительности действия стрессорирующего фак-

тора. Величины адаптационных температур могут индуцировать температурнозависимую перестройку генома, приводящую к закаливанию растений, что обеспечивает реализацию максимально возможной потенциальной устойчивости растительного организма. При повреждающих температурах генетически контролируемые перестройки

Печатается в рамках сотрудничества и обмена опытом.

метаболизма затруднены, метаболические превращения выходят из-под контроля генома, обратимые изменения переходят в необратимые, при этом происходят структурные и функциональные нарушения [31].

Природа формирования механизмов холодостойкости растений разнообразна и может выражаться в повышении активности водорастворимых белков за счет увеличения их общей концентрации и концентрации активных при низкой температуре ферментов, в поддержании мембранных липидов в жидком состоянии путем ингибирования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), возрастании уровня ненасыщенных липидов, в увеличении содержания фосфолипидов [36]. Ответной реакцией организма на воздействия низкой температуры следует считать влияние на степень сродства фермента к субстрату [11], а также синтез новых изоформ некоторых ферментов [24]. Выявлена положительная коррелятивная зависимость между морозостойкостью растений и активностью ферментов пероксидазы и о-дифенолоксидазы [20, 21, 30].

При понижении температуры изменяются физические свойства липидного бислоя мембран: мембрана сжимается, существенно уменьшается ее площадь, увеличивается толщина, снижается гидрофобное взаимодействие и усиливается электростатическое. Все это приводит к высвобождению периферических мембранных белков из мембраны, изменению структуры интегральных белков, что наряду с прямым влиянием

низкой температуры на структуру белков существенно модифицирует их ферментативные свойства [34]. При продолжительном воздействии низких температур в растении происходят однородное сжатие и затвердевание липидного бислоя клеточных мембран, что приводит к снижению проницаемости мембран для воды и к повышению потерь воды над поглощением ее в корнях, к росту энергии активации мембранных ферментов в хлоропластах и митохондриях, к ингибированию фотосинтеза, дыхания и к метаболической коме [36]. Кратковременная повторяющаяся гипотермия активно индуцирует синтез стрессовых белков [6]. Однако природа новых стресс-белков изучена недостаточно. Изменения в составе белков при кратковременном температурном воздействии представляет интерес в связи с поиском белков-маркеров, необходимых для селекции растений на морозостойкость [19]. Приобретение растениями свойств, повышающих их холодо- и морозостойкость, связано с изменением в клетках состава веществ: крахмала, фруктозанов, сахарозы, органических и нуклеиновых кислот, аминокислот, растворимых фенолов, тиолов, гидролизуемых танинов, липидов, белков (ферментов), АТФ, НАДФ и др. [10, 36, 38]. В работах [5, 8, 32, 36] высказано предположение, что реакция растений на изменения температуры обусловлена способностью приспосабливать направленность биохимических процессов к новым условиям среды, приводящих к нарушению нормального обмена веществ

в клетках. При этом гибель растений может наступать задолго до физических изменений цитоплазмы, связанных с образованием льда.

Известно, что при неблагоприятных условиях существования в растениях резко возрастает содержание этилена, абсцизовой кислоты и других функционально активных соединений, снижающих обмен веществ, увеличивающих устойчивость растений к повреждениям, тормозящих ростовые процессы, способствующие старению и переходу растительного организма в состояние покоя [22]. Проявлением ответной реакции на действие стрессирующих факторов в живых организмах является резкое активирование свободнорадикальных реакций в клетке в начальный период стресса [23]. Антиоксиданты способны связывать свободные радикалы, которые способствуют развитию деструктивных окислительных процессов, усиливающих при воздействии на клетку повреждающих физических и химических факторов различной природы. Накопление антиоксидантов способствует ингибированию деструктивных реакций свободнорадикального окисления [12].

Целью настоящего исследования было выявление компенсаторных механизмов антиоксидантной системы семян и проростков пшеницы на действие низких положительных температур и УФ-излучения, а также изучение влияния низких и высоких концентраций антиоксидантов различной природы на прорастание семян пшеницы.

Объектом исследования служило семя пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская 12. Для индукции перекисного окисления липидов семена при влажности 5—6% в чашках Петри помещали под ртутно-кварцевую лампу БНПО2-30-001У3,5 (Россия) с интенсивностью облучения 30 Вт/м², расположенную на расстоянии 25 см от семян.

Для анализа продуктов тиобарбитуровой кислоты и антиоксидантов 1 г семян или сырой массы проростков гомогенизировали в фарфоровой ступке с 3 мл 50% раствора этанола, гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000 g. Супернатант для исследования активности пероксидазы получали, аналогично используя 0,1 М натрий-фосфатный буфер pH 7,0.

Содержание малонового диальдегида исследовали по реакции с тиобарбитуровой кислотой при 532 нм, $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [4] с нашими модификациями [29]. К 0,5 мл супернатанта последовательно добавляли 0,5 мл 1% раствора тритона X-100, 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,8 мл 0,06 М ТБК. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 10 мин. Охлаждали при температуре 15°С 30 мин. Для стабилизации окраски добавляли 0,2 мл 5 мМ трилона Б и 5—10 мл 96% этанола. Контролем служила пробирка, в которую добавляли те же растворы, кроме ТБК. Содержание МДА в проростках выражали в нмоль/г сухой массы.

Анализ антиоксидантов проводили по методике [21]. К 0,2 мл супернатанта последовательно добавляли 0,2 мл 0,2% FeCl₃

в 96% этаноле. Затем объем доводили до 3 мл 96% этанолом и выдерживали 10 мин в темноте. Определение антиоксидантов проводили по калибровочному графику, построенному для кверцетина. Количество антиоксидантов, содержащихся в проростках, рассчитывали в мкг/г сухой массы.

Активность пероксидазы определяли при 22°С по начальной скорости окисления в их присутствии о-дианизидина перекисью водорода. К 2,5 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0) добавляли 0,2 мл раствора супернатанта и 0,1 мл 0,43 мМ раствора о-дианизидина в 96% этаноле. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода. Увеличение поглощения раствора при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}/\text{см}^{-1}$) [22] для продукта окисления о-дианизидина после быстрого перемешивания реагентов регистрировали на спектрофотометре. За единицу активности фермента принимали количество о-дианизидина (мкмоль), окисленного за 1 мин 1 г сухой массы.

Каталитические параметры пероксидазы (K_m , V_m , k_{cat}) определяли как описано в работе [22, 23].

Спектрофотометрические исследования проводили в двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы «Varian» (США).

Контрольные и опытные (после УФ-облучения) семена вначале замачивали в дистиллированной воде на 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 23°С на свету, смачивая их дистиллированной водой (10 мл на чашку

Петри). Число семян в одной чашке — 100, число повторностей в каждом варианте — 4, число опытов — 4.

В работе использовали о-фенантролин фирмы «Serva» (Германия), ТБК — о.с.ч. (Реахим), тритон X-100 — препарат фирмы «Ferak Berlin» (Западный Берлин), этанол очищали перегонкой, о-дианизидин марки ч. очищали возгонкой в вакууме, перекись водорода — 30% водный раствор, о.с.ч.

В таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки, полученные из 4 отдельных опытов, каждый из которых состоял из 4 повторностей (чашек Петри). Статистическую ошибку для средней проводили по методике [13], используя ППП Снедекор V2. Различия обсуждались при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты

Высокие концентрации пероксидазы в семенах, проростках и корнях пшеницы позволяют предположить об участии фермента в метаболических процессах, происходящих во время покоя семян и в период их активного прорастания. Пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы, активность которой определяет уровень устойчивости растений к различным воздействующим факторам в процессе онтогенеза. Фермент способен катализировать окисление различных неорганических и органических соединений. Обладая широкой субстратной специфичностью, фермент может проявлять свойства оксидазы. Поэтому активность

пероксидазы возрастает с увеличением дыхания семян при выходе их из состояния вынужденного покоя. Средство пероксидазы с различными соединениями, являющимися субстратами фермента, может характеризоваться величинами констант Михаэлиса-Ментен (K_m) и каталитической константой ($k_{кат}$). В случае использования неочищенного фермента, когда неизвестна его концентрация, характеристической величиной может быть V_m , рассчитанная на 1 г сухой массы. Субстраты пероксидазы можно условно разделить на 2 группы: быстро окисляемые и медленно окисляемые. При совместном присутствии субстраты могут окисляться последовательно, при этом быстро окисляемый субстрат активирует окисление медленно окисляемого субстрата [15, 27].

Намизучены динамика активности пероксидазы и содержание АО в семенах пшеницы в течение 24 ч набухания при 5°С (I группа) и 23°С (II группа). Видно, что процесс набухания семян сопровождается возрастанием активности фермента (рис. 1).

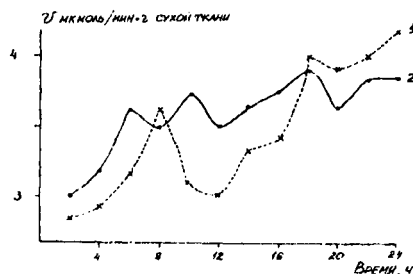


Рис. 1. Активность пероксидазы зерен пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени набухания при 5°С (1) и 23°С (2).

Активность пероксидазы и содержание АО в зародыше у семян I группы были выше в 1,5 раза. У этих же семян в процессе набухания повышалась активность пероксидазы в эндосперме и кожуре в 1,5 и 1,8 раза соответственно (табл. 1).

Определены величины каталитических констант пероксидазы зерен пшеницы в реакциях пероксидазного окисления о-дианизидина и аскорбиновой кислоты (табл. 2). Показано, что K_m мало изменяется в исследованном диапазоне pH 5—7. K_m по ОДН незначительно отличается от константы Михаэлиса, определенной для очищенного препарата пероксидазы хрена, выпускаемой фирмой «Reanal», тогда как K_m по АК в 5—9 раз ниже показателей очищенного препарата. Такие различия можно объяснить присутствием в гомогенате зерен посторонних субстратов пероксидазы, участвующих в совместном окислении аскорбиновой кислоты [27].

Активность пероксидазы в проростках пшеницы, семена которых замачивали при 5°С и 23°С, проявлялась в своеобразной динамике и зависела от природы исследуемых частей пшеницы (зерно, надземная часть или корни) (рис. 2). Отмечался линейный рост активности пероксидазы в зерне с небольшим опережением у зерен II группы (рис. 2а). Зависимости активности пероксидазы надземной части проростков пшеницы имели вид «качелей» с постепенным снижением в первые 3—4 дня, а затем повышением к 7-му дню прорастания проростков (рис. 2б). Причем более высокие показатели активности пероксидазы были

Биохимические показатели органов семян пшеницы сорта Омская 12 после 24 ч замачивания в дистиллированной воде при разных температурах (в расчете на 1 г сухой массы)

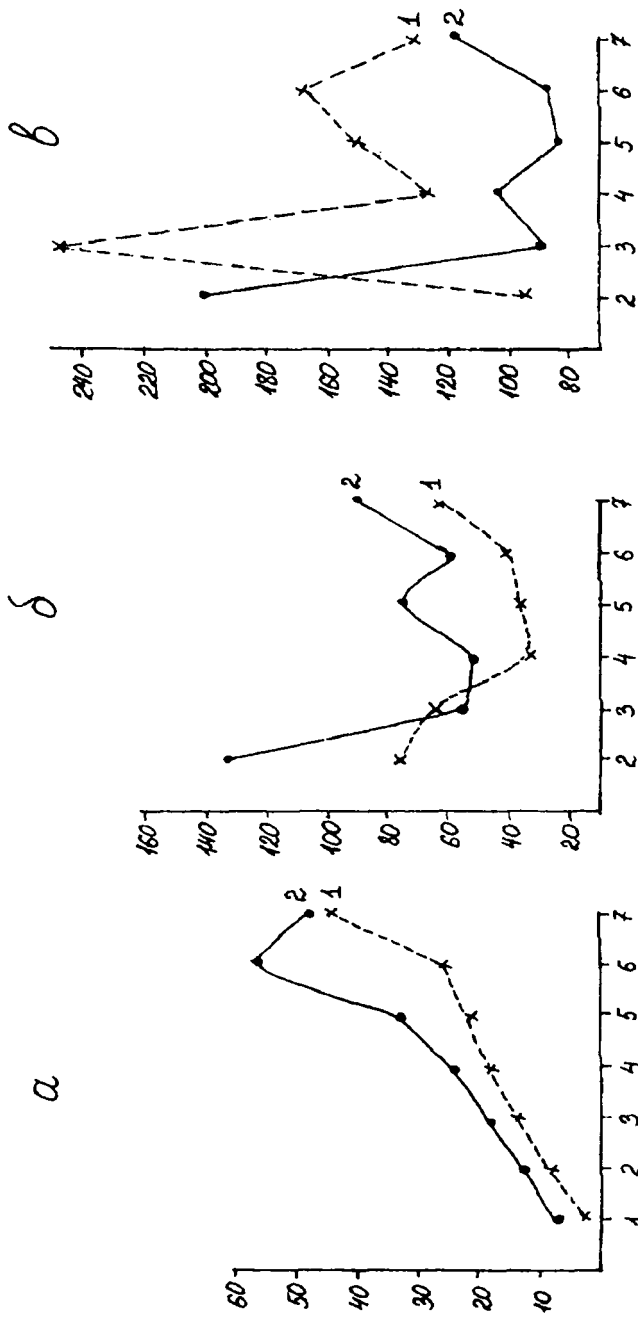
Орган	ПО, мкмоль		ПОЛ, нмоль		АО, мкг	
	5°С	23°С	5°С	23°С	5°С	23°С
Сухое зерно	3,70±0,21	3,60±0,25	25,3±1,8	21,8±1,1	85,2±3,2	88,3±3,8
Кожура семени	0,44±0,03	0,25±0,02	23,4±1,5	25,5±1,6	160,7±12,1	176,2±13,4
Эндосперм	0,42±0,03	0,28±0,03	19,6±1,2	20,7±1,3	133,3±6,5	124,3±11,3
Щиток	22,2±0,1	21,7±0,1	—	—	256,4±15,2	256,4±18,8
Зародыш	59,3±0,5	39,0±0,3	95,3±5,4	117,4±8,5	398,4±24,7	285,7±21,5

Величины K_n (мкМ) реакций пероксидазного окисления о-дигидроксилина (ОДН) и аскорбиновой кислоты (АК), катализируемых пероксидазой зерен и 7-суточных проростков (надземная часть и корни) пшеницы сорта Омская 12

рН	Сухое зерно		Проростки пшеницы								
			надземная часть				корни				
	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК	ОДН	АК	
5,0	54±2	38±2	62±2	94±3	263±12	22±1	70±2	62±2	33±2	40±2	340±18
5,5	59±3	35±2	137±4	115±3	161±9	67±3	51±2	124±4	27±2	45±2	170±8
6,0	57±2	30±2	49±2	64±2	33±2	65±2	15±1	67±2	11±1	40±2	190±11
7,0	39±1	26±1	12±1	36±2	24±1	52±2	18±1	39±2	12±1	30±1	230±14

* Зерна пшеницы замачивали при 5°С.

** Пероксидаза хрена — препарат фирмы «Reanal».



ВРЕМЯ ПРОРАСТАНИЯ, ДНИ

Рис. 2. Активность пероксидазы в зерне (а), надземной части (б) и корнях (в) проростков пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени их прорастания. Семена предварительно замачивали в дистиллированной воде при 5°С (1) и 23°С (2) в течение 24 ч, а проращивали при 23°С.

у семян II группы. Своеобразная динамика проявлялась в активности пероксидазы корней (рис. 2в). В корнях семян II группы в первые 2—3 дня понижалась активность пероксидазы и только на 7-й день отмечался рост. Зависимость активности пероксидазы у корней семян I группы принимала вид затухающих колебаний с возрастанием активности на 3-й и 6-й день и понижением к 7-му дню прорастания корней до нормы. Причем активность пероксидазы в корнях семян I группы была в 1,5—2,5 раз выше, чем у корней семян II группы.

Нами отдельными экспериментами было показано отсутствие в супернатанте активаторов и ингибиторов пероксидазы. Поэтому мотивацией к повышению активности пероксидазы является, по видимому, проявление компенсаторных антиоксидантных механизмов, направленных на предотвращение развития окислительного повреждения тканей [3], вызванных воздействием низких температур. Поскольку ключевую роль в развитии окислительного повреждения играют активные формы кислорода (АФК): O^2 , H_2O_2 , $HO\cdot$, органические радикалы [4], образование которых наиболее интенсивно протекает в корнях растений [17].

Важную роль в повышении активности пероксидазы также могут выполнять конформационные перестройки глобулы вновь синтезированных форм пероксидазы при низкой температуре, затрагивающие активный центр фермента. Причиной этих изменений могут служить SH-группы, которые содержат по 6—8 каждого

изофермента пероксидазы, и в нативном ферменте, синтезированном при 20—22°С, они образуют 3—4 дисульфидные связи [40]. Причиной изменения структуры пероксидазы могут быть нарушения фолдинга при низких положительных температурах [33], в результате этого на поверхности глобулы фермента появляются свободные SH-группы. Приобретенная таким образом лабильность структуры проявляется в повышении активности фермента. Аналогичные изменения наблюдали у рибулозодифосфаткарбоксилазы холодостойкой линии томата, у которой сохранение SH-групп сопровождалось проявлением более высокой устойчивостью к низким температурам [35].

Увеличение активности пероксидазы может быть вызвано синтезом на холоде в семенах пшеницы новых изоферментов пероксидазы или накоплением соединений, являющихся субстратами фермента, индуцирующих его синтез, что будет проявляться в возрастании активности пероксидазы. Однако высокие концентрации субстратов пероксидазы могут ингибировать фермент, способствуя таким образом увеличению концентрации перекиси водорода в клетках.

Подтверждением высказанных предположений являются результаты по динамике содержания МДА и АО в корнях и надземной части проростков пшеницы зерен I и II групп (рис. 3). Видно, что показатели уровня ПОЛ и содержания АО находятся в прямой зависимости ($r = 0,5$). Повышение содержания АО преимущественно

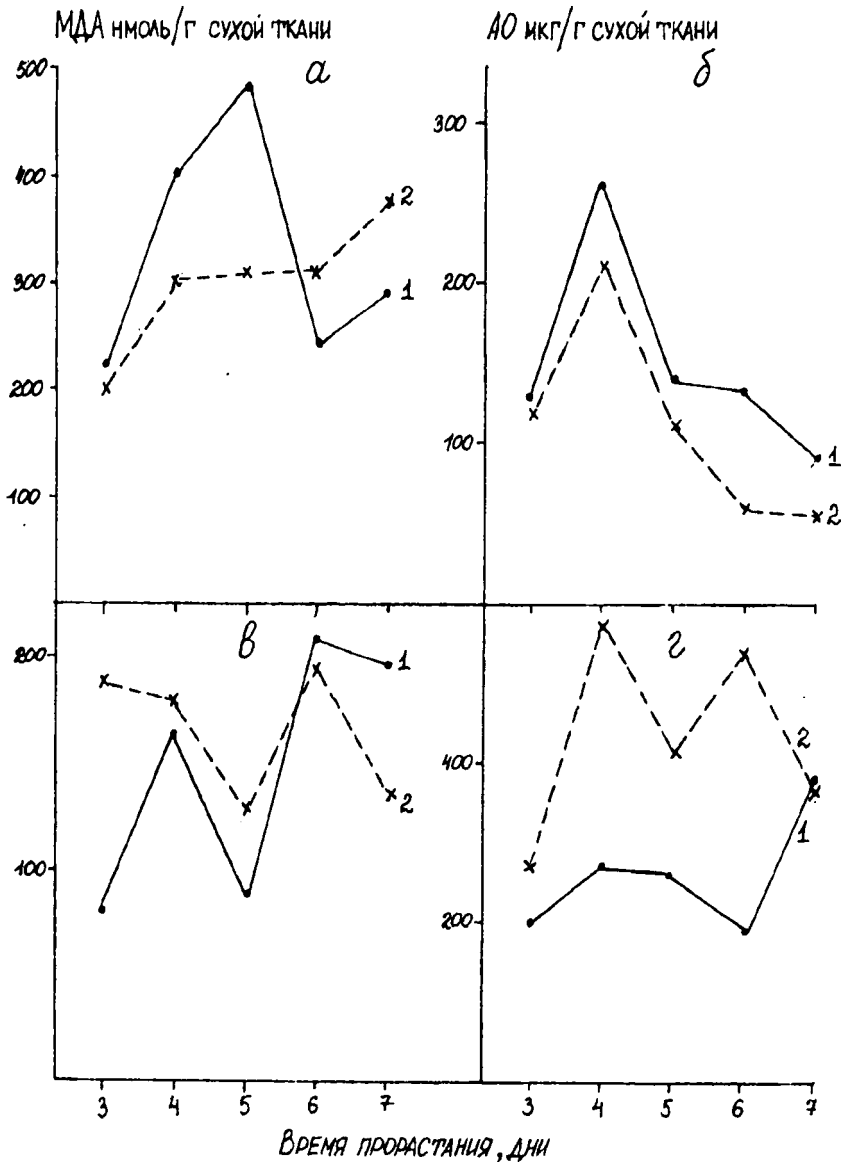


Рис. 3. Влияние температуры замачивания семян пшеницы сорта Омская 12 на содержание малонового диальдегида и антиоксидантов в их надземной части (а, б) и корнях (в, г) этилированных проростков. Условия те же, что на рис. 2.

сопровождается повышением ПОЛ, тогда как активность пероксидазы возрастает с уменьшением содержания антиоксидантов ($r = -0,65$). В случае увеличения содержания АО отмечается понижение активности пероксидазы, а увеличение активности пероксидазы сопровождается понижением уровня ПОЛ ($r = -0,65$). Величины показателей корреляции, возможно, были выше, если бы при проведении анализа учитывалось влияние всех компонентов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза и т. д.). Однако подобные исследования планируется провести в дальнейших экспериментальных исследованиях.

Наблюдаемые изменения можно объяснить в рамках единого представления о роли пероксидазы и АО, являющихся компонентами антиоксидантной системы, в регулировании процессов перекисного окисления в живых организмах. Пероксидаза способна использовать в качестве субстратов антиоксиданты и перекись водорода. Фермент катализирует реакцию, в которой АО окисляется, а перекись водорода восстанавливается до воды. Однако в высоких концентрациях антиоксиданты способны ингибировать фермент и таким образом способствовать увеличению уровня ПОЛ в клетках. Взаимная регулируемость системы позволяет контролировать ПОЛ в живых организмах и поддерживать его на определенном, постоянном уровне.

Нами изучены каталитические параметры пероксидазы 7-суточных проростков и корней пшени-

цы. Установлено, что различия в величинах K_m по ОДН пероксидазы проростков пшеницы (надземная часть и корни) (см. табл. 2), а также V_m проростков пшеницы семян I и II групп незначительны (табл. 3). Основные изменения наблюдаются у K_m по АК пероксидазы корней пшеницы зерен I и II групп. Величины K_m зерен I группы выше в 1,5—2 раза по сравнению с зернами II группы. Значения V_m по ОДН и АК пероксидазы корней пшеницы зерен I группы в 1,5—2 раза выше, чем корней пшеницы зерен II группы. В то же время K_m по АК пероксидазы корней пшеницы зерен II группы в 2—7 раз ниже, чем у пероксидазы надземной части проростков этой же группы. Следует отметить различия в показателях K_m по ОДН корней пшеницы, которые были в 1,5—3 раза выше, чем у пероксидазы хрена. Также установлены сильные различия в K_m по АК для пероксидазы хрена в сравнении с пероксидазой из надземной части и корней проростков пшеницы. K_m по АК у корней пшеницы зерен соответственно I и II групп в 3—13 и 6—19 раз ниже, чем у пероксидазы хрена (см. табл. 2). Такую высокую разницу в значениях K_m можно объяснить, во-первых, тем, что в исследованиях были использованы гомогенаты корней пшеницы, содержащие весь спектр изоферментов пероксидазы, тогда как пероксидаза хрена являлась очищенным препаратом, в составе которого содержатся преимущественно изоферменты В и С [1]. Во-вторых, наличием в гомогенате тканей большого количества антиоксидантов, являющихся

Величины V_m (микромоль/мин г сухой массы) и $K_{кат}$ (сек⁻¹) реакций пероксидазного окисления ОДН и АК, катализируемых пероксидазой зерен и 7-суточных проростков (надземная часть и корни) пшеницы сорта Омская 12

рН	Сухое зерно		Проростки пшеницы								Корни хрена**	
			надземная часть				корни					
	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК	ОДН*	ОДН	АК*	ОДН	АК	ОДН**	АК**
5.0	28±2	2,9±0,1	43±2	40±2	55±3	129±6	50±2	87±4	25±2	2500±200	18±1	
5.5	21±2	2,0±0,1	57±3	47±2	28±2	154±7	36±2	103±10	21±2	3000±250	7±0	
6.0	14±1	1,7±0,4	25±2	28±1	8±0	117±6	22±1	62±3	16±1	2200±200	9±0	
7.0	4±0	1,3±0,0	8±0	9±0	9±0	50±3	21±1	20±1	15±1	600±50	4±0	

* Зерна пшеницы замачивались при 5°С.

** Значения $K_{кат}$.

*** Пероксидаза хрена — препарат фирмы «Reanal».

субстратами пероксидазы, в присутствии которых окисление ОДН и АК может возражать [27].

Биологически активные вещества (БАВ) очень часто используются для повышения всхожести семян [18]. В зависимости от природы они могут регулировать протекание метаболических процессов, активировать или ингибировать различные ферменты, влиять на проницаемость мембран клеток. Среди этой группы следует выделить соединения, обладающие антиоксидантной активностью и являющиеся субстратами пероксидазы, к которым относятся строфантин, дигоксин, аминазин, викасол, аскорбиновая кислота, гидрохинон и др. [15, 25, 26]. Обладая разным механизмом действия, они в малых концентрациях активировали прорастание семян, а в больших — понизили их всхожесть (табл. 4). При этом проявлялась индивидуальная чувствительность семян пшеницы к используемым соединениям. Низкие концентрации строфантина, аскорбиновой кислоты, норадреналина, салицилата натрия, аминазина и этанола повышали всхожесть семян пшеницы на 15—20%, тогда как высокие концентрации исследуемых соединений понижали их всхожесть. Наибольшим ингибирующим эффектом обладали соединения, которые можно расположить в следующем порядке: 2,4-динитрофенол > гидрохинон > аминазин > дигоксин > салицилат натрия > этанол > норадреналин > строфантин > викасол. Выраженный ингибирующий эффект 2,4-динитрофенола, по-видимому, можно объяснить его способ-

ностью разобщать окислительное фосфорилирование, перенаправлять поток протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, стимулируя митохондриальную АТФазу [7].

Полученные результаты дают основание считать, что семена пшеницы можно использовать при изучении токсичности различных соединений, применяемых в сельском хозяйстве и медицине.

Известно, что к факторам, повышающим всхожесть семян, относятся УФ-излучение, низкие и высокие температуры. Эффект малых доз УФ-облучения проявляется в иницировании образования свободных радикалов, стимулирующих процессы прорастания семян пшеницы. Совместное действие низких температур и УФ-облучения на семена недостаточно изучено. При этом известно, что использование сочетанного действия низких температур и этанола может повышать всхожесть семян пшеницы. Так, после сеникации пшеницы аммиачной селитрой в фазе молочно-восковой спелости всхожесть семян понижалась до 56% и сохранялась 100% их жизнеспособность. В случае обработки таких семян 10 мМ раствором этанола при 4°С в течение 1,5—4,5 ч снимался гипобиотический эффект селитры, повышалась всхожесть семян до 96—100% [28].

Установлено, что высокие концентрации этанола понижают всхожесть семян пшеницы [2, 28], тогда как малые дозы УФ-облучения могут повышать их всхожесть [29]. Известно, что свет может усиливать чувствительность растений к низким температурам.

Таблица 4

Влияние различных концентраций функционально активных веществ на всхожесть семян пшеницы сорта Омская 12

Реагент	Концентрация, мМ	Всхожесть, %	Реагент	Концентрация, мМ	Всхожесть, %	
Контроль	—	76±6	Норадреналин	0,001	84±6	
Этанол	0,100	80±8		0,006	83±7	
	0,500	87±9		0,060	81±6	
	1,000	79±7		0,600	78±5	
	10,000	76±6		6,000	50±3	
	100,000	67±6	Аскорбиновая кислота	0,002	85±6	
	500,000	48±3		0,020	82±5	
	1000,000	24±2		0,200	84±6	
	1200,000	12±1		2,000	90±8	
	1400,000	3±1		10,000	69±4	
	1600,000	0		50,000	64±3	
1800,000	0	100,000		43±2		
Строфантин	0,028	90±7		500,000	25±2	
	0,280	66±5		1000,000	11±1	
	2,800	68±5		2,4-динитро-фенол	0,001	79±7
	28,000	64±4	0,010		78±6	
280,000	67±6	0,100	72±5			
Дигоксин	0,014	63±4			1,000	5
	0,140	72±7		5,000	0	
	1,400	75±8		10,000	0	
	14,000	65±6	Салицилат натрия	0,010	89±7	
	28,000	50±4		0,100	84±6	
	55,000	36±3		1,000	83±6	
	83,000	8±1		10,000	72±5	
	110,000	0		100,000	8±1	
138,000	0	1000,000		0		
Гидрохинон	0,050	76±7		Аминазин	0,007	86±4
	0,500	74±6			0,070	82±3
	5,000	74±6	0,700		80±3	
	7,500	66±5	7,000		35±2	
	10,000	54±4		70,000	0	
	25,000	29±2	Викасол	0,300	74±7	
	50,000	0		30,000	79±8	

Примечание. Замачивание и проращивание семян проводили в растворах БАВ при 23°С. После 24 ч замачивания семена проращивали при естественном освещении в течение 7 дней. Реагенты растворяли в дистиллированной воде. Представлены средние данные и их стандартные ошибки для 3 независимых опытов по 100 семян в каждом.

Так, при температуре 10—13°С и высокой радиации появляются некротические пятна на листьях растений и снижается интенсивность фотосинтеза при стабильном содержании хлорофилла [37, 39]. Нами изучено влияние 5 и 60 мин УФ-излучения на всхожесть семян пшеницы сорта Омская 12. Из данных табл. 5 видно, что у семян, предварительно подвергнутых УФ-облучению, всхожесть на 12—15% ниже, чем у облученных семян после замачивания в растворах этанола различных концентраций. Причем это особенно проявляется при длительном, в течение 60 мин УФ-облучении семян. Низкая температура (14°С) стимулирует прорастание семян, при этом понижается ингибирующий эффект этанола. УФ-облучение таких семян дополнительно может увеличить их всхожесть (табл. 5).

Исходная влажность семян обычно составляет 5—6%. При погружении в воду в течение 16—24 ч идет активное поглощение воды семенами. В этот период «запускаются» основные биохимические процессы, обеспечивающие последующее прорастание семян, на протекание которых оказывают влияние биологически активные соединения. Поэтому данный отрезок времени является наиболее важным в проявлении специфичности действия функциональных веществ. Показано, что всхожесть семян пшеницы имеет выраженный колебательный характер, динамика которого зависит от используемой концентрации вещества. Так, набухание семян в течение 24 ч в растворах с малыми концентрациями этанола

повышалось их всхожесть, особенно при замачивании семян в течение первых 4—8 ч (рис. 4). Аналогичный эффект был отмечен и в работе [9]. Замачивание в растворах с высокими концентрациями этанола понижало всхожесть семян пшеницы. Однако влияние этанола зависело от температуры среды и продолжительности замачивания.

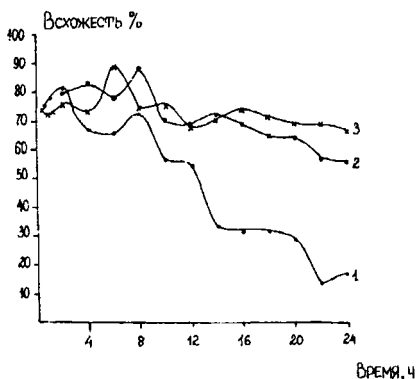


Рис. 4. Динамика всхожести семян пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания в растворах этанола, М: 1 — 1,0, 2 — 0,5, 3 — 0,0005.

Условно у всхожести семян в зависимости от времени замачивания в растворе 1 М этанола можно выделить 3 периода. Первый, активационный, который наблюдается при замачивании семян в этаноле в течение 2 ч, при этом всхожесть семян повышается на 10—15%. Второй период, повышенной сопротивляемости к действующему фактору, выявляется в течение 2—12 ч. В этот период можно наблюдать резкие эпизодические всплески повышения всхожести семян при общей тенденции к ее снижению. Третий период — период устойчивого

Влияние различных концентраций этанола и УФ-облучения на всхожесть семян пшеницы сорта Омская 12

Концентрация этанола, М	Без УФ-облучения	Время УФ-облучения семян, мин								
		до замачивания			после замачивания					
		5	60	60	5	5	60			
Контроль	59±3	70±5*	59±3	61±3*	59±3	65±3*	53±3	73±4*	70±5	72±5*
0,2	44±2	58±4	50±3	63±3	53±3	73±3	59±3	68±4	66±4	68±4
0,5	38±2	54±3	45±2	47±2	44±3	58±2	52±3	53±3	48±3	58±3
1,0	24±2	34±2	25±2	32±2	10±2	12±2	22±2	40±3	28±2	33±2
1,2	14±1	22±1	8±1	10±1	4±1	8±1	11±1	20±2	21±2	25±2
1,4	3±1	8±1	2±1	5±1	2±1	2±1	7±1	2±1	13±1	10±1
1,6	0	0	0	0	0	2±1	2±1	3±1	5±1	6±1

* В колонке показатели всхожести семян, замачивание и проращивание которых проводили в растворах этанола при 14°C.

понижения всхожести, когда продолжительное действие используемого вещества последовательно уменьшает всхожесть семян.

Естественно, выделение этих периодов в действии функционально активных веществ условно и зависит от природы соединений и их концентрации. Большие концентрации высокотоксичных соединений могут сглаживать динамику проявления реактивности семян на действующий фактор. Так, при замачивании семян пшеницы в растворах 2,4-динитрофенола, аминазина и дигоксина может проявляться своеобразная динамика понижения всхожести семян. На рис. 5 видно, что при использовании высоких концентраций реагентов в первые 60 мин замачивания всхожесть семян повышалась, а в дальнейшем она понижалась в течение первых 4—8 ч с последующим угнетением до минимального

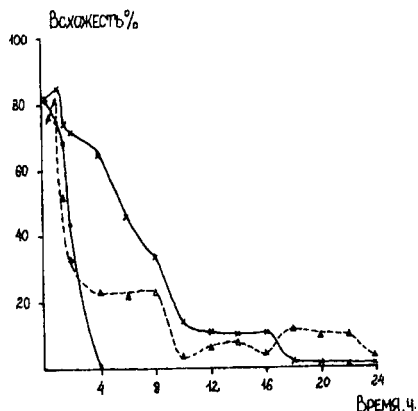


Рис. 5. Зависимость всхожести семян пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания в растворах 1 мМ 2,4-динитрофенола, 7 мМ аминазина и 138 мМ дигоксина.

уровня. Однако замачивание семян при низкой температуре может уменьшать ингибирующий эффект используемых реагентов, возможно, за счет снижения проницаемости мембран семян пшеницы для биологически активных веществ используемого раствора [36].

На рис. 6 видно, что замачивание семян при низкой температуре может снимать ингибирующий эффект высоких концентраций реагентов, сглаживая при этом динамику понижения всхожести семян с проявлением повышенной их устойчивости к воздействию фактору. На кривых можно выделить период повышенной устойчивости семян к биологически активным соединениям, который проявляется в основном между 8 и 16 ч замачивания. Неоднородность кривых всхожести семян позволяет предположить проявление у них компенсаторных механизмов, противодействующих проникновению с водой функционально активных веществ. Действие БАВ может выражаться в понижении протекания биосинтетических процессов или ингибировании активности ферментов семян пшеницы. Причем высокие концентрации антиоксидантов могут понижать активность пероксидазы и за счет этого регулировать продолжительность гипобиотического состояния семян. Возможно, что ведущую роль в поддержании гипобиоза семян пшеницы выполняет пероксидаза, уменьшение активности которой углубляет покой семян, что проявляется в задержке их прорастания и понижении всхожести. Насыщая зерна ксенобиотиками, можно добиваться повышения их

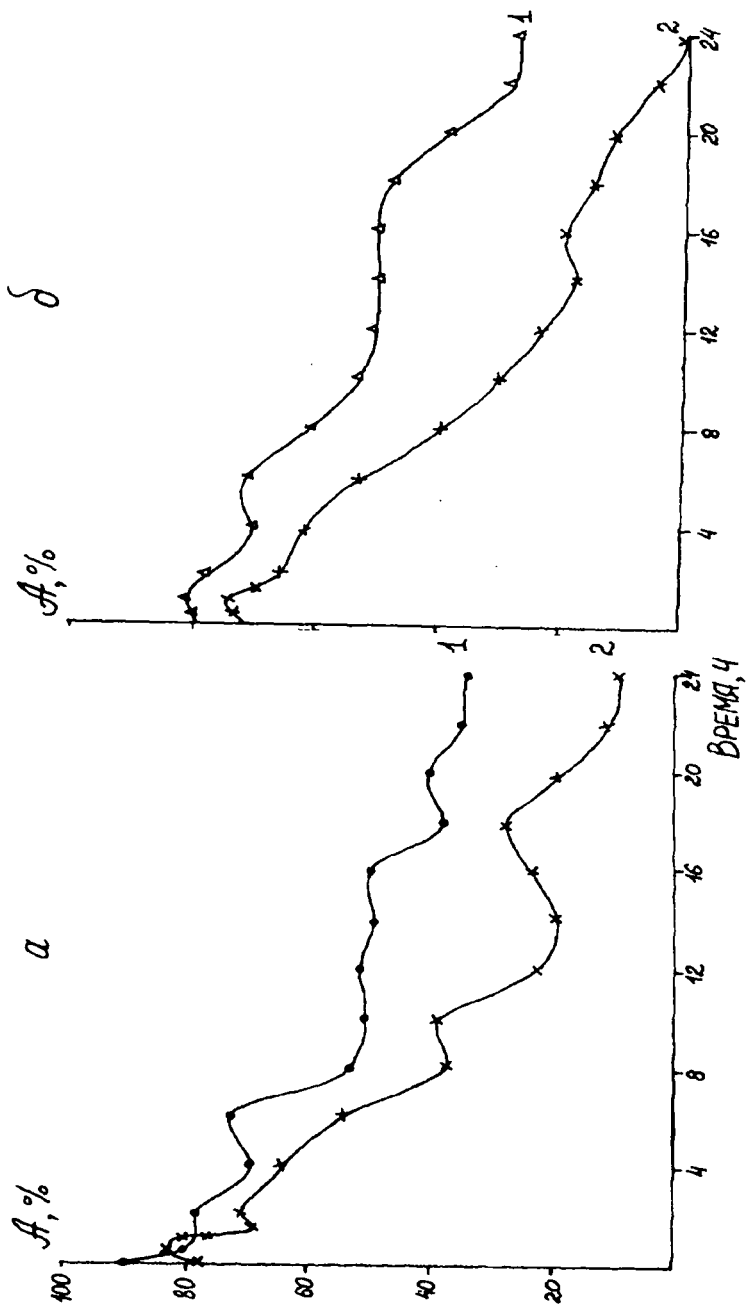


Рис. 6. Зависимость выходности семян пшеницы сорта Омская 12 от времени замачивания в растворах 0,1 М салицилата натрия (а) и 2 М этилового спирта (б) при 5°С (1) и 23°С (2).

посевных качеств, а также сопротивляемости зерен и растений к экзогенным патогенным факторам (действию низкой и высокой температуры, микробам и др.).

Полученные данные позволяют предложить наиболее оптимальное время замачивания семян в растворах БАВ, которое в наших исследованиях приходится на первые 4 часа. Замачивание семян в течение этого времени не принесет им существенного вреда и не повлияет на посевные качества. Обработка семян пшеницы биологически активными веществами в течение 2 ч будет способствовать повышению их всхожести.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреева В. А.* Фермент пероксидазы. М.: Наука, 1988. — 2. *Андреанова Ю. Е., Бакуридзе П. Л.* Влияние ретиноидов и этилового спирта на прорастание семян. — Изв. РАН, серия биол., 1996, № 5, с. 565—570. — 3. *Бурлакова Е. Б., Алексенко А. В., Молочкина Е. М. и др.* Биоаниоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975. — 4. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. — 5. *Войников В. К.* Реакция генома клетки на температурный стресс. — Рост и устойчивость растений. Иркутск: Наука, 1988, с. 154—163. — 6. *Войников В. К., Корытов М. В.* Влияние условий гипотермии на синтез стрессовых белков в проростках озимой пшеницы. — Физиол. раст., 1993, т. 40, № 4, с. 589—595. — 7. *Досон Р., Эллиот Д., Эл-*

лиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. — 8. *Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф.* Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Би., 1984. — 9. *Зауралов О. А., Колмыкова Т. С., Лукаткин А. С.* Влияние продолжительности предпосевной обработки семян регуляторами роста на прорастание и содержание в них фитогармонов. — Сельскохозяйственная биология, 1997, № 1, с. 80—84. — 10. *Климов С. В.* Биоэнергетическая концепция устойчивости растений к низким температурам. — Успехи соврем. биологии. 1997, т. 117, № 2, с. 133—154. — 11. *Клячко О. С., Полосухина Е. С., Озернюк Н. Д.* Температура вызывает структурные и функциональные изменения лактатдегидрогеназы из скелетных мышц рыб. — Биофизика, 1993, т. 38, № 4, с. 596—601. — 12. *Колупаев Ю. Е., Трунова Т. И.* Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов. — Физиол. и биохим. культ. раст., 1992, т. 24, № 6, с. 523—531. — 13. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. — 14. *Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В.* Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. — Биохимия, 1977, т. 42, № 8, с. 1372—1379. — 15. *Лебедева О. В., Угарова Н. Н.* Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена. — Изв. АН. Серия хим., 1996, № 1, с. 25—32. — 16. Методы биохимического

- исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агрпромиздат, 1987. — 17. *Минибаева Ф.В., Рахматулина Д.Ф., Гордон Л.Х., Вылегжанина Н.Н.* Роль супероксида в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток. — Докл. АН, 1997, т. 355, № 4, с. 554—556. — 18. *Михно А.Н., Минакова С.Г., Харченко Л.В.* Влияние предпосевной обработки семян биологически активными веществами на полевую всхожесть и развитие проростков сахарной свеклы. — Физиол. и биохим. культ. раст., 1997, т. 29, № 2, с. 107—114. — 19. *Мишарин С.И., Антипина А.И., Войников В.К.* Влияние холодового шока на антигенный состав озимой ржи и пшеницы. — Физиол. и биохим. культ. раст., 1997, т. 29, № 3, с. 215—219. — 20. *Негру П.В., Медведева Т.Н.* Электрофоретические спектры легкорастворимых белков, пероксидазы и о-дифенолоксидазы в связи с зимостойкостью винограда. — Физиол. и биохим. культ. раст., 1990, т. 22, № 5, с. 469—476. — 21. *Негру П.В., Медведева Т.Н., Кожокару В.А. и др.* Эколого-физиологические механизмы морозостойкости винограда. Кишинев: Штиинца, 1988. — 22. *Пахомова В.М.* Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений. — Цитология, 1995, т. 37, № 1, с. 66. — 23. *Пахомова В.М., Чернов И.А.* Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений. — Изв. РАН, серия биол., 1996, № 6, с. 705—715. — 24. *Петрова О.В., Мишустина П.С.* Изоферменты пероксидазы в листьях кукурузы при пониженных температурах. — Физиол. и биохим. культ. раст., 1976, т. 8, № 2, с. 174—177. — 25. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В.* Стационарная кинетика пероксидазного окисления 2-хлор-10-(3-диметиламинопропил)-фенотиазина в присутствии пероксидазы хрена. — Биохимия, 1988, т. 63, № 6, с. 85—90. — 26. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В.* Аскорбиновая кислота — медленно окисляемый субстрат пероксидазы хрена. — Биохимия, 1997, т. 62, № 12, с. 1686—1690. — 27. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В.* Влияние антиоксидантов (дигоксина, кверцетина и аскорбиновой кислоты) на каталитические свойства пероксидазы хрена. — Биохимия, 1988, т. 63, № 6, с. 63—68. — 28. *Рогожин В.В., Егорова П.С.* Влияние экзогенных этанола и ацетальдегида на жизнеспособность семян. — В кн.: Этанол и его метаболизм в высших организмах. Якутск: ЯНЦ СО АН СССР, 1990, с. 90—99. — 29. *Рогожин В.В., Курилюк Т.Т.* Влияние ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов в проростках пшеницы. — Биохимия, 1996, т. 61, № 8, с. 1432—1439. — 30. *Рудьшин С.Д.* Исследование легкорастворимых белков и пероксидазы листьев в связи с устойчивостью виноградного растения. — Виноделие и виноградарство СССР, 1983, № 3, с. 43—45. — 31. *Титов А.Ф.* Молекулярно-генетический подход к проблеме терморезистентности растений. — В кн.: Эколого-физиоло-

гические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Петрозаводск: 1978, с. 14—19. — 32. *Туманов И.И.* Физиология закаливания и морозостойкость растений. М.: Наука, 1979. — 33. *Угоров И.В., Егоров А.М.* Моделирование пространственной структуры пероксидазы хрена (изофермент С). — Докл. АН, 1997, т. 356, № 5, с. 696—699. — 34. Effects of low temperatures on biological membranes / Eds. Morris G.J., Clarke A. London etc.: Acad. press, 1981. — 35. *Graham D., Patterson B.* — Ann. Rev. Plant Physiol., 1982, vol.

33, p. 347—372. — 36. *Levitt J.* Responses of plants to environmental stresses. V. 1. N.Y. etc.: Acad. press, 1980. — 37. *Taylor A.O., Rowley J.A.* — Plant Physiol., 1971, vol. 47, p. 713—718. — 38. Temperature and life / Ed. by Precht H. et al. Berlin etc.: Springer, 1973. — 39. *Scott D.* CO₂ exchange of plants. 3. Temperature acclimatisation of Three species / N.Z.: J. Bot., 1970, vol. 8, N 3, p. 369—379. — 40. *Shin J.H., Shannon L.K., Kay E., Lew J.Y.* — J. Biol. Chem., 1971, vol. 246, N 14, p. 4546—4551.

*Статья поступила 16 августа
1998 г.*

SUMMARY

Peroxidase activity dynamics and antioxidant content of wheat seed during 24 hours of swelling at 5°C (group 1) and at 23°C (group 2) have been studied. Peroxidase activity and antioxidant content in germ of seed of group 1 was 1.5 times higher. In the swelling process peroxidase activity in these seeds increases 1.5 and 1.8 times respectively. The size of peroxidase catalytic constants of wheat grain is determined in reactions of peroxidase oxidation of o-dianizidine and ascorbic acid. It is shown that K_m does not change much in the studied range of pH 5—7. It has been found that in wheat sprouts higher level of antioxidants increases lipid peroxidation, and peroxidase activity grows with the decrease in antioxidant content. The effect of antioxidants on germinating power of wheat seed has been studied. It is shown that low concentrations of the substances used increase germinating power of the seeds, while high concentrations decrease their germinating power, which is expressed in specific dynamics. Recommendations on utilization of the studied compounds for improving sowing qualities of wheat seed are presented.