

УДК 633.11:581.142.04

ВЛИЯНИЕ рН И ПРИРОДЫ ИОНОВ СРЕДЫ НАБУХАНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

Б.М. КЕРШЕНГОЛЬЦ, В.В. РОГОЖИН

(Якутский государственный университет им. М.К. Аммосова,
Якутская государственная сельскохозяйственная академия)

Показано, что ионы водорода при рН среды менее 5,0 способны пассивно транспортироваться в семена пшеницы, вызывая пропорциональное закисление среды, а гидроксил-ионы практически не проникают в семена даже при отрицательном градиенте рН $-4,3$. Для протекания всего комплекса биохимических процессов при прорастании интегральное рН гомогената семян пшеницы должно находиться в пределах от 5,7 до 6,7, хотя всхожесть семян пшеницы сохраняется в широком интервале рН — от 5,0 до 11,0. Предложена гипотеза, объясняющая эффективность внесения органических удобрений для повышения урожайности зерновых культур.

Химический состав среды набухания активно влияет на прорастание семян благодаря интенсивному ионному обмену через мембранный комплекс семени [7—9]. Однако в доступной нам литературе эти зависимости исследовались только в слабокислой и нейтральной среде [1, 3, 17]. Вместе с тем известно, что многие ключевые ферменты метаболизма растительной клетки имеют рН-оптимумы не только в нейтральной области рН (алкогольдегидрогеназа, ФЭП-карбоксилаза и др.),

но и в кислой (маликэнзим, кислые амилазы, протеазы и др.), либо в щелочной (липазы, ЛДГ в реакции окисления лактата, АДГ в реакции окисления этанола с оптимумом рН 8,0—10,0) [10, 15]. Показано [16, 18], что рН внутриклеточной среды может изменяться при протекании тех или иных биохимических реакций (синтезе три- и дикарбоновых кислот, выделении CO_2 из клетки), причем эти изменения рН могут играть функциональную роль в регуляции процессов при прорас-

танин семян, например, при смещении метаболических равновесий гликолиза и спиртового брожения, карбоксилирования и декарбоксилирования, при активации расщепления запасных питательных веществ эндосперма [12].

Целью данной работы было изучение влияния рН и природы ионов среды набухания на процессы прорастания семян пшеницы и формирование проростков. Для этого исследовались следующие параметры при прорастании семян пшеницы: масса 7-дневного проростка и содержание хлорофилла, рН гомогената зерен и буферного раствора до и после замачивания семян.

Методика

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Якутянка 224 проращивали на чашках Петри (по 100 шт в каждой) в 4-кратной повторности. Действие рН и природы ионов определяли после 15-часового замачивания семян пшеницы с влажностью 5—8% в 0,1 М буферных растворах с рН от 3,0 до 13,4, затем семена раскладывали на фильтровальной бумаге, смоченной буферным раствором (10 мл на чашку Петри) и проращивали при 23°С [5, 13]. Контроль — замачивание и проращивание на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. С помощью механического гомогенизатора из семян получали однородную массу, в которую добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:3 (на 1 г семян 3 мл воды). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000 г. Определяли

рН супернатанта и среды до и после замачивания семян. В опыте использовали буферные растворы со следующими значениями рН: натрий ацетатный — 3,0—6,0; натрий фосфатный — 5,8—8,0; натрий фосфатно-лимоннокислый — 5,8—8,0; калий фосфатно-лимоннокислый и калий фосфатный — 5,0—8,0; калий глициновый — 6,0—13,4; натрий глициновый — 8,0—11,0; карбонатный — 8,6—11,0. Для определения рН растворов использовали рН-метр марки ОР 211/1 (Венгрия). Точность измерения — до $\pm 0,01$ ед. рН. Калибровку прибора проводили стандартными буферными растворами. Содержание хлорофилла определяли по [11] с использованием двухлучевого спектрофотометра Shimadzu (Япония). Для этого навеску свежих побегов массой 0,5 г мелко измельчали, растирали в фарфоровой ступке с 5 мл ацетона, а затем в растертую массу добавляли ацетон до общего объема в 10 мл. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием 10 мин при 7000 г. Количество хлорофилла рассчитывали в условных единицах на 1 г сырой ткани. Всхожесть семян пшеницы определяли стандартным методом на 7-й день проращивания (ГОСТ—12038—66), их жизнеспособность — тетразолюно-топографическим методом [6].

Результаты

Полученные зависимости рН гомогената семян и Δ рН среды после набухания от рН исходных буферных растворов приведены на рис. 1.

При набухании семян в дистиллированной воде ($pH\ 6,05 \pm 0,05$) значение pH гомогената семян уменьшалось до $5,73 \pm 0,05$, а pH воды — увеличивалось до $7,75 \pm 0,60$. Набухание семян в натрий(калий)фосфатном и натрий(калий)глициновом буфере в интервале pH от 8,0 до 11,0 уровень ΔpH среды повышался на 0,65—0,70, при набухании семян в растворах с pH от 5,0 до 3,0 — на $-0,75$ ед. При pH раствора больше 8,0 набухание семян вызывало подкисление среды, достигающее при $pH\ 12,0$ ΔpH среды $-0,98$ ед. pH , тогда как при pH среды меньше 5,0 отмечалось ее подщелачивание и закисление раствора гомогената зерен.

При набухании семян в натрий-ацетатном буферном растворе с $pH\ 5,0$ и ниже значения pH гомогената уменьшались прямопропорционально понижению pH

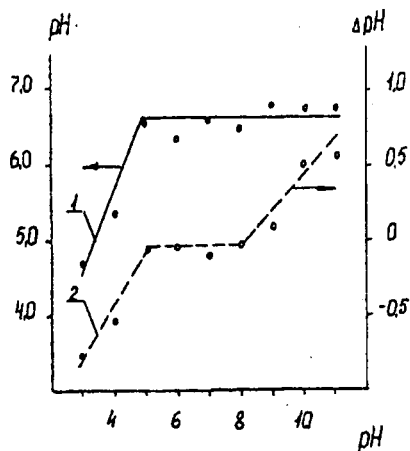


Рис. 1. Зависимость pH гомогената семян (1) и ΔpH среды после набухания (2) от pH исходных буферных растворов.

раствора с тангенсом угла наклона, близким к 1,0.

Во всем изученном интервале pH мы не выявили достоверных различий в изменении pH среды при набухании семян в зависимости от природы буферного раствора.

Анализ зависимости энергии прорастания, всхожести семян, массы 7-дневного проростка и содержания хлорофилла в нем от pH среды прорастания показал (рис. 2), что все они в процессе прорастания семян имели 2 экстремума при $pH\ 6,0$ и $9,0$. Причем такие показатели, как масса 7-дневного проростка, содержание хлорофилла в нем, при $pH\ 9,0$ были даже достоверно выше, чем при $pH\ 8,0$. Максимальные значения параметров наблюдались в калийфосфатных и калийглициновых растворах при $pH\ 9,0$ — $10,0$. В кислой области pH ацетат-ион отмечалось более медленное прорастание семян (отставание — 30—50%).

Некоторая задержка в развитии корневой системы проростков по сравнению с контролем наблюдалась при $pH\ 9,0$, но не при буферном растворе с $pH\ 6,0$ (таблица). При замене ионов натрия ионами калия развитие корневой системы улучшалось, но сохранялось отставание в росте главного корня. Вероятно, при снижении молярности буферного раствора это отставание можно ликвидировать.

Длина (см) 7-дневного проростка, главного и боковых корней пшеницы при проращивании семян на дистиллированной воде, 0,1 М калий(натрий)фосфатном буферных растворах $pH\ 6,0$ и $9,0$.

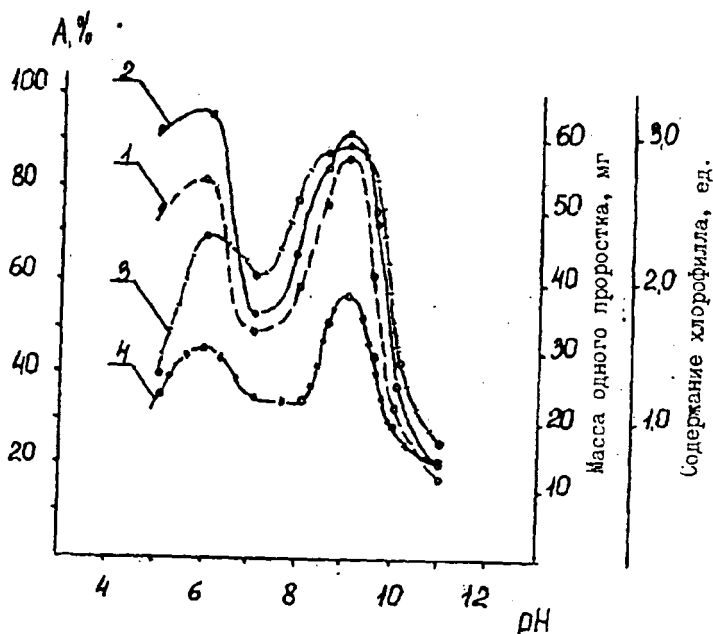


Рис. 2. Зависимости энергии прорастания (1), всхожести (2), массы 7-дневного побега (3) и содержание хлорофилла (4) от pH среды прорастания.

Следует отметить следующие особенности влияния pH растворов на набухание семян пшеницы:

— наличие 2-го максимума при pH 9,0 у pH-зависимостей 4 исследованных параметров процесса прорастания семян;

— сохранение pH гомогената семян на постоянном уровне 6,5—6,7 при изменении pH среды набухания от pH 5,0 до 11,0. При этом градиент pH между семенами и средой достигал крайних значений +1,5 и -4,3.

Таблица

Часть проростка	Контроль	pH 6,0		pH 9,0	
		Na ⁺ -фосфат	K ⁺ -фосфат	Na ⁺ -фосфат	K ⁺ -фосфат
Проросток	9,10	4,76	4,53	10,10	5,68
Главный корень	5,18	1,38	3,00	1,51	2,67
Боковые корни	3,81	2,62	2,10	3,41	2,43

В доступной нам литературе мы не нашли ни аналогичных данных, ни гипотез, которые можно было бы привлечь для их объяснения. Нами предлагается следу-

ющая интерпретация полученных данных.

Во-первых, кривая pH-зависимости кислотности гомогената семян указывает на то, что ионы

водорода при рН среды менее 5,0 способны пассивно транспортироваться в семена, вызывая пропорциональное закисление среды, т.е. кислых градиентов рН более +1,5 мембранный комплекс семян не держит. Гидроксил-ион в семенах практически не проникает даже при отрицательном градиенте рН -4,3. Для протекания всего комплекса биохимических процессов при прорастании интегральное рН гомогената семян должно находиться в пределах от рН 5,7 до 6,7 несмотря на секрецию органических кислот на первом этапе пробуждения семян щитком в эндосперм [14]. Поэтому всхожесть семян сохраняется в широком интервале рН среды — от 5,0 до 11,0.

Во-вторых, одним из лимитирующих звеньев процессов прорастания семян является транспорт из семени молекул CO_2 , конечного продукта аэробных процессов генерации энергии при гидролизе и окислении запасных веществ.

В-третьих, CO_2 транспортируется в среду набухания через мембранный комплекс семян путем анионного обмена в виде бикарбонат-иона HCO_3^- ; в области рН, в которой угольная кислота в большей части существует в виде иона CO_3^{2-} , анионный обмен осуществляется не столько выделением 2-заряженного иона карбоната, сколько выделением 2-заряженных анионов дикарбоновых кислот — промежуточных продуктов катаболических цепей, например, малата. В последнем случае энергетический распад и окисление запасных веществ семени ускорятся, хотя коэффициент полезного действия снизится.

В-четвертых, при анионном обмене происходит обмен не только ионов одинаковой заряженности,

но и бикарбоната на H_2PO_4^- или анион глицина, малата на HPO_4^{2-} так же, как и при работе «протонной помпы», выводящей ионы водорода из семян в обмен на ионы калия [2, 4]. Следовательно, в зависимости от рН среды набухания, т.е. формы существования ионов в буфере, по-разному будет происходить анионный обмен. В дистиллированной воде за счет некоторого осмотического шока при набухании часть ионов (калия, фосфата и т.д.) выйдет из семян в воду, но ионообменные помпы начнут вводить K^+ опять в клетку, выводя H^+ наружу, а образующийся CO_2 будет находиться в виде HCO_3^- (так как рН в семенах около 6,0, а угольная кислота имеет $\text{pK}_1 = 6,35$, а $\text{pK}_2 = 10,3$) и обмениваться на фосфат-ионы в виде H_2PO_4^- (поскольку рН дистиллированной воды также около 6,0, а у фосфорной кислоты $\text{pK}_1 = 2,15$, $\text{pK}_2 = 7,21$, $\text{pK}_3 = 12,33$). За счет преимущественного выделения бикарбонат-ионов дистиллированная вода будет немного подщелачиваться, а семена — подкисляться. Этот эффект мы и получили в эксперименте. Поскольку в указанных условиях образующийся CO_2 выделяется беспрепятственно, прорастание идет интенсивно.

В области рН от 5,0 до 8,5 пойдет уменьшение в среде набухания доли ионов H_2PO_4^- , а при рН от 5,3 до 8,0—8,5 — нарастание доли ионов HCO_3^- . Оптимальными с точки зрения анионного обмена бикарбонат-иона из семян (рН 6,3—6,7) и иона H_2PO_4^- из среды будут рН среды 5,5—6,0, что соответствует максимальной активизации процессов прорастания семян пшеницы. При этом глицин

тоже будет хорошо осуществлять анионный обмен с HCO_3^- ; так как в этом интервале рН он существует в виде цвиттер-иона и при сопутствующей работе водородной помпы глицин очень хорошо проникает в семена, особенно при рН 6,0. Последнее было показано нами в специальном эксперименте с помощью меченого по углероду глицина. Проникающая способность последнего за 24 ч набухания составила при рН 6,0—8,4, а при рН 8,0—3,3 мкмоль/г. Таким образом, и в глициновом, и в фосфатном буфере оптимальными для прорастания семян пшеницы в слабокислой и нейтральной средах набухания с точки зрения анионного обмена будут значения рН около 6,0. При этом среда набухания может подщелачиваться, но в меньшей степени, чем дистиллированная вода, из-за емкости буферного раствора. Такой анионный обмен будет происходить до рН 8,2—8,5.

При более высоких значениях рН фосфат среды набухания весь перейдет в форму HPO_4^{2-} и анионный обмен с анионом HCO_3^- семян станет невозможным, однако может начаться обмен 2-заряженно-го аниона малата. Оптimum содержания иона HPO_4^{2-} приходится на рН 9,0—9,5. Следовательно, в этой области рН будет происходить наиболее интенсивный обмен двухзаряженными анионами, инициирующий ускорение прорастания семян пшеницы. Глицин в области рН более 8,7 начнет переходить в форму однозаряженного аниона, улучшится его анионный обмен с бикарбонатом семян, т.е. в присутствии фосфата, а особенно в присутст-

вии глицина при рН 9,0 вторично улучшится анионный обмен, что, по-видимому, и приводит к появлению 2-го максимума на кривых рН-зависимостей изученных параметров прорастания семян. Однако из-за ускоренного истощения питательных веществ в проросших семенах их дальнейшее развитие может затормозиться. Среда набухания при этом будет подкисляться за счет выделения дикарбоновых кислот (в присутствии фосфата) или активации работы протонной помпы (по градиенту концентрации ионов водорода).

В карбонатном буфере анионный обмен с бикарбонатом семян будет существенно затруднен, поэтому, вероятно, в карбонатном буфере процессы прорастания столь резко замедляются.

С другой стороны, в кислой и слабокислой средах анионного обмена ацетата с бикарбонатом почти нет, а если он и идет при рН 6,0, то в клетку вводится ацетат-анион, который сильно подкисляет среду набухания, а также понижает интенсивность прорастания.

Таким образом, концепция анионного обмена может явиться одной из гипотез, объясняющих наблюдаемые эффекты. Она раскрывает влияние среды набухания на протекание процессов гипобиоза семян и позволяет предположить, что при щелочных значениях рН почвы будут неэффективными фосфорные удобрения и что их необходимо заменить органическими, содержащими аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко С.С., Алехина Н.Д. Поглощение нитратной и аммо-

нийной форм азота растениями кукурузы при различных значениях рН питательной среды. — Физиол. раст., 1967, т. 14, № 1, с. 130—135. — 2. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт. — Соросовский общобразовательный журнал, 1997, № 6, с. 14—20. — 3. Костюкович М.Ф., Кондратьев М.Н., Третьяков Н.Н. Поглощение ионов растениями кукурузы в зависимости от катионного состава и рН солевого раствора. — Изв. ТСХА, 1988, № 4, с. 74—80. — 4. Лайтфут Э. Явления переноса ионов в живых системах. М.: Мир, 1977. — 5. Международные правила анализа семян. М.: Колос, 1984. — 6. Методические указания по определению жизнеспособности семян тетразолино-топографическим методом. Л., 1980. — 7. Обручева Н.В. Прорастание семян. — В кн.: Физиол. семян. М., 1982, с. 223—274. — 8. Обручева Н.В., Антипова О.В., Иванов И.М. Запуск роста осевых органов и его подготовка при прорастании семян, находящихся в вынужденном покое. 1. Накопление осмотических активных веществ в осевых органах семян кормовых бобов. — Физиол. раст., 1993, т. 40, № 5, с. 742—748. — 9. Обручева Н.В., Антипова О.В. Запуск роста осевых органов и его подготовка при прорастании се-

мян, находящихся в вынужденном покое. — Физиол. раст., 1994, т. 41, № 3, с. 443—447. — 10. Плещиков Б.П. Биохим. с.-х. растений. М.: Агропромиздат, 1987. — 11. Практикум по физиологии растений / Под ред. Н.Н. Третьякова. М.: Колос, 1982. — 12. Родионова Н.А., Капсельянец Л.В., Середницкий П.В., Килимник А.Ю. Гемиплоиды зерна злаков и ферменты, катализирующие их расщепление. — Приклад. биохим. и микробиол., 1992, т. 28, № 5, с. 645—665. — 13. Рогожин В.В., Романова А.Ю. Влияние высоких положительных температур на резистентность семян пшеницы и караганы древовидной (*Saragana arborescens* Lam.). — Изв. ТСХА, 1997, вып. 1, с. 36—41. — 14. Шипарев С.М., Чупрова Г.В., Полевой В.В. Секретция кислот изолированными щитками кукурузы. — Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. Биол., 1976, № 21, с. 130—133. — 15. Якушкина Н.И. Физиол. раст. М.: Просвещение, 1993. — 16. Keller C.P., Taylor J.E.P. — Can. J. Bot., 1989, vol. 67, N 10, p. 2944—2949. — 17. Marre E., Lado P., Rasi-Caldogno F., Colombo R. — Plant Sci. Lett., 1973, vol. 1, N 5, p. 179—186. — 18. Cleland R. — Annu. Rev. Plant Physiol., 1971, vol. 22, N 1, p. 197—203.

Статья поступила 14 ноября 1997 г.

SUMMARY

It is shown that H-ions with pH of the habitat less than 5.0 are able to be conveyed in a passive way to wheat seed causing proportional acidity of the habitat, and hydroxyl-ions practically don't penetrate into seeds even with negative gradient pH of the habitat — 4.3 unit. Integral pH of the homogeneity of wheat seeds should be within the limits of pH from 5.7 to 6.7 for proceeding of the whole complex of biochemical processes during germination. Though germination of wheat seeds remains with a large interval in pH of the habitat from 5.0 to 11.0. A hypothesis which explains the efficiency of applying organic compounds for increasing cropping capacity of cereals is suggested.