

УДК 582.542:633.11

*А. А. ДЕРЕВИНСКАЯ<sup>1</sup>, Л. Ф. КАБАШНИКОВА<sup>2</sup>*

## **ВЛИЯНИЕ ЗАЩИТНО-СТИМУЛИРУЮЩИХ СОСТАВОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ СЕМЯН НА ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ ПРОРОСТКОВ И АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ В НОРМЕ И ПРИ ВОДНОМ ДЕФИЦИТЕ**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка,  
Минск, e-mail: derevinskaja@rambler.ru,*

<sup>2</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск*

*(Поступила в редакцию 01.12.2011)*

**Введение.** Зерновые культуры, в том числе яровая пшеница, составляют основную часть питания населения в самых разных регионах. Широкое распространение зерновых культур обусловлено их генетическим разнообразием и возможностью выращивания в различных почвенно-климатических условиях. По оценкам многих исследователей потери урожая сельскохозяйственных культур от неблагоприятных факторов окружающей среды достигают 50 % их генетически обусловленной продуктивности.

Удовлетворение потребности растения в воде – одно из важных условий его существования и жизнедеятельности. Водный режим растения претерпевает существенные изменения в течение индивидуального развития, что обусловлено разной потребностью растительного организма в воде в разные периоды онтогенеза [3, 9]. Дефицит воды в почве и растениях существенно изменяет структурно-функциональное состояние растительных клеток, процессы поглощения и транспорта воды, функционирование устьичного аппарата, транспирацию, фотосинтез, дыхание, ферментативную активность, минеральное питание, рост и целый ряд других процессов [3, 9]. Отсюда следует необходимость поиска приемов эффективного возделывания сельскохозяйственных культур в засушливых условиях, поскольку засуха является одним из экологических факторов среды, который ограничивает продуктивность зерновых культур.

Известно, что применение защитно-стимулирующих составов (ЗСС), содержащих физиологически активные соединения и средства защиты для предпосевной обработки семян, стимулирует процессы прорастания и развития растений злаков, позволяет направленно влиять на эффективность прохождения всех этапов онтогенеза, способствует повышению продуктивности [12] и устойчивости растений при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды [5, 13, 16].

Цель данной работы – изучение адаптивной реакции проростков пшеницы на мембранно-клеточном уровне на действие новых ЗСС на основе полимеров – модифицированного сополимера акриламида с акрилатом натрия и мочевино-формальдегидной смолы с включением микроэлементов и регуляторов роста [6, 13] в условиях нормального и лимитированного водоснабжения. Важным прикладным аспектом исследований является разработка экспресс-методов диагностики структурно-функционального состояния злаковых растений в условиях водного дефицита.

**Объекты и методы исследования.** Исследования проводились на прорастающих семенах и проростках яровой пшеницы сорта Ростань в лабораторных условиях. Предпосевную обработку семян ЗСС проводили вручную, непосредственно перед их высеванием в бумажные рулоны.

Для обработки семян использовали стандартный препарат Сейбит П, полученный НАВОДО «Сейбит» (г. Гомель, Беларусь), и его модификацию с добавлением в компонент № 1 регулятора роста кремний-органической природы (БИРР, 0,3 %) и сернокислого железа (1,5 %). Комплексные препараты Сейбит вносили из расчета 10 л/ т семян, в том числе компонент №1 – жидкие микроудобрения в виде неорганических солей (600 мл/ т семян), компонент № 2 – гидрогумат (200 мл/ т

семян), полимерный пленкообразователь – мочевино-формальдегидная смола (80 мл/ т семян), компонент № 4 – жидкие комплексные удобрения (1 л/ т семян), фунгицид раксил в полной дозе (1,5 кг/ т семян).

Препарат ЗСС 7 был получен в НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета (г. Минск, Беларусь) на основе модифицированного сополимера акриламида с акрилатом натрия (САА) путем его радиационного сшивания, добавления микроэлементов в хелатной форме и регулятора роста гидрогумат. Норма расхода ЗСС 7 составляет 10 л/ т семян, в том числе модифицированный полимер (100 г/ т семян), гидрогумат (200 мл/ т семян), комплекс микроэлементов (100 г/ т семян), фунгицид раксил в полной дозе (1,5 кг/ т семян).

Активность амилаз определяли в прорастающих семенах согласно методике [15], после замачивания зерновок пшеницы в воде на 24 ч и последующего их высушивания в течение 12 ч при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния. Контролем служили прорастающие семена при нормальном водоснабжении. Данный прием – замачивание-высушивание, как известно, вызывает в начавшем развитии зародыше водный дефицит и комплекс адаптивных приспособительных реакций к условиям засухи [3].

Изучение активности  $H^+$ - АТФаз клеток корней проростков пшеницы проводили после обработки семян так же, как и в эксперименте по исследованию активности амилаз: зерновки пшеницы подвергали замачиванию-высушиванию, затем семена высаживали в бумажные рулоны и выращивали на водопроводной воде на полихроматическом свете (люминесцентные лампы ЛБ-40, 120 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>), при температуре 20–22 °С и 16-часовом фотопериоде. Контролем служили проростки семян, выращенные в условиях нормального водоснабжения, которые не подвергались приему замачивания-высушивания. В опытах для исследования ацидофицирующей активности корней использовали проростки 4-дневного возраста, которые размещали корнями в стаканы с раствором, содержащим KCl и CaCl<sub>2</sub> в концентрации 10<sup>-3</sup> М и 10<sup>-4</sup> М соответственно, рН растворов измеряли в течение 4 дней после помещения корней в стакан с использованием рН-метра [5]. Скорость подкисления инкубационной среды корневой системой проростков пшеницы оценивали по величине удельной концентрации протонов в растворе. Методы, основанные на рН-метрии среды, не раскрывая механизмов функционирования, позволяют выявить наличие либо отсутствие активности электрогенных насосов в заданных условиях [2].

При определении проницаемости мембран для свободных нуклеотидов проростки выращивали в бумажных рулонах на полихроматическом свете (люминесцентные лампы ЛД-40, 120 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>), при температуре 20–22 °С и 16-часовом фотопериоде в течение 7 дней на водопроводной воде (контроль). Условия водного дефицита создавали в течение 45 ч путем переноса 5-дневных проростков в бумажных рулонах на 3%-ный раствор полиэтиленгликоля 6000, который создает осмотический потенциал – 0,28 МПа. Как было показано ранее, такой способ выращивания позволяет создать водный дефицит (WD), **равный 20 % в первых листьях проростков злаков** [14, 7]. Проницаемость клеточных мембран листьев и корней 7-дневных проростков пшеницы оценивали по выходу низкомолекулярных нуклеотидов из клеток в дистиллированную воду спектрофотометрическим методом, который разработан в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» [5].

Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием пакета программ Excel и Statistica 6.0. Оценку достоверности полученных данных проводили по Б. А. Доспехову [4].

**Результаты и их обсуждение.** В процессе прорастания семян в результате гидролиза и фосфоролита крахмал распадается на более простые соединения. По мере набухания сухих семян в период их прорастания возрастает активность гидролитических ферментов, при этом содержание крахмала падает. Гидролитический распад запасного крахмала может протекать при участии четырех видов гидролаз:  $\alpha$ -амилазы,  $\beta$ -амилазы, глюкоамилазы и амилопектин-1,6-глюкозидазы.

В литературе имеются данные о том, что использование фиторегуляторов и микроэлементов для предпосевной обработки семян повышает суммарную активность  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз при прорастании семян, причем тенденция к такому повышению наблюдается уже с 12 ч набухания [10].

В наших экспериментах в условиях нормального водоснабжения активность амилаз в прорастающих семенах пшеницы во всех вариантах опыта оставалась на уровне контроля. При по-

следовательном высушивании-замачивании прорастающих семян было обнаружено повышение активности амилаз в результате предпосевной обработки ЗСС, причем наибольший стимулирующий эффект по сравнению с необработанным контролем отмечен в вариантах опыта с использованием стандартного препарата Сейбит П и его модифицированного состава с добавлением регулятора роста БИРР и железа в форме неорганической соли (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние предпосевной обработки семян ЗСС на активность амилаз в прорастающих семенах яровой пшеницы Ростань

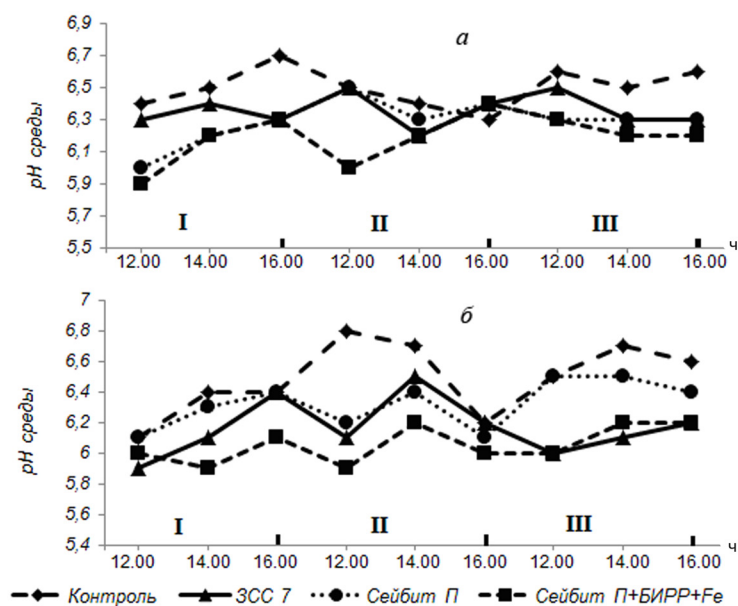
Вариант опыта	Активность амилаз ( в 1 мг крахмала за 1 ч на 1 мл раствора)			
	Нормальное водоснабжение	% к контролю	Высушивание-замачивание	% к контролю
Контроль	0,634 ± 0,013	100	0,645 ± 0,002	100
ЗСС 7	0,632 ± 0,005	100	0,734 ± 0,006	114
Сейбит П	0,634 ± 0,003	100	0,841 ± 0,005	130
Сейбит П + БИРР + Fe	0,627 ± 0,002	99	0,783 ± 0,037	121

С целью анализа эффективности использования ЗСС на основе модифицированных препаратов для предпосевной обработки семян была оценена активность протонных насосов плазмалеммы клеток корней и проницаемость мембран для свободных нуклеотидов у проростков пшеницы. Данные показатели рассматриваются многими авторами как наиболее адекватные при оценке структурно-функционального состояния клеточных мембран в условиях стресса [5].

В основе формирования функционального ответа клеток на внешние воздействия лежат взаиморегулируемые изменения энергетического обмена и ионного транспорта через плазмалемму, которые относятся к числу ранних реакций клеток растений на действие стрессора [1]. Ацидофицирующая активность корней является интегральным показателем уровня энергетического и ионного метаболизма, поскольку с работой протонных насосов связан трансмембранный перенос многих ионов органических веществ [11]. При экзогенных воздействиях физиологически активными веществами наблюдаются изменения функциональной активности белков мембранных АТФаз клеток корней, что в свою очередь изменяет скорость подкисления среды корневой системой [5]. В эксперименте была исследована динамика подкисления среды корневой системы проростков пшеницы, а также ее изменение в результате предпосевной обработки семян ЗСС и при замачивании-высушивании семян.

Динамика изменения рН среды при инкубации корневой системы 4-дневных проростков пшеницы на протяжении последующих 3 сут изображена на рисунке. Снижение рН среды является одним из показателей активации выхода протонов из клетки, что может свидетельствовать о возрастании активности входящих токов ионов в цитоплазму. В наших исследованиях у проростков контрольного варианта, выращенных в нормальных условиях водоснабжения, наблюдалось снижение рН среды. В вариантах опыта с использованием ЗСС данный показатель снижался значительно сильнее на протяжении всего времени проведения эксперимента. У проростков, выращенных из семян, подвергнутых процедуре замачивания-высушивания, активация протонной помпы плазмалеммы корней была аналогичной. При этом отмечено более существенное увеличение амплитуды изменений величины рН в результате обработки семян модифицированными препаратами ЗСС 7 и Сейбит П. Полученные результаты отражают важную роль транспортных АТФаз плазмалеммы в поддержании гомеостаза и устойчивости растительных клеток, которые активизируются при стрессе. Как известно, в регуляции активности  $H^+$ -АТФазы и  $H^+$ -проводимости плазмалеммы при различных стрессовых воздействиях на растительные клетки участвуют сигнальные системы, чувствительные к изменению концентрации ионов  $H^+$  и  $Ca^{2+}$  в цитоплазме [1].

На основе полученных данных нами были оценены следующие показатели: концентрация протонов в растворе, удельная концентрация протонов в растворе и процент сохранения активности протонных насосов после воздействия. В наших исследованиях установлено, что предпосевная обработка семян модифицированными ЗСС активизировала протонную помпу корней проростков пшеницы, выращенных в условиях нормального водоснабжения, по сравнению с необработанным контролем (табл. 2), о чем свидетельствует увеличение удельной концентрации ионов водорода в инкубационной среде, рассчитанной с учетом сырой массы корней.



Влияние предпосевной обработки семян ЗСС на величину рН среды инкубации корней 5–7-дневных проростков яровой пшеницы Ростань при выращивании в условиях нормального водоснабжения (а) и после проведения замачивания-высушивания (б): I – 5-е сутки, II – 6-е сутки, III – 7-е сутки

Т а б л и ц а 2. Влияние предпосевной обработки семян ЗСС на активность протонных насосов корней 7-дневных проростков яровой пшеницы Ростань

Вариант опыта	рН	[H <sup>+</sup> ] мкМ	% к контролю	[СН <sup>+</sup> ] мкМ / г сырой массы корней	% к контролю
<i>Нормальное водоснабжение</i>					
Контроль	6,49 ± 0,07	0,32	100	0,23	100
ЗСС 7	6,36 ± 0,06	0,44	137	0,30	130
Сейбит П	6,29 ± 0,07	0,51	159	0,39	169
Сейбит П + БИРР + Fe	6,19 ± 0,15	0,65	203	0,56	243
<i>Замачивание-высушивание</i>					
Контроль	6,48 ± 0,06	0,33	100	0,31	100
ЗСС 7	6,16 ± 0,04	0,69	209	0,62	200
Сейбит П	6,31 ± 0,04	0,50	151	0,53	170
Сейбит П + БИРР + Fe	6,14 ± 0,06	0,72	218	0,84	271

У проростков, выращенных из семян после замачивания-высушивания, общая концентрация ионов водорода в растворе оказалась в 1,4–1,6 раза выше по сравнению с контролем при обработке семян препаратами ЗСС 7 и Сейбит П соответственно и в 2 раза выше при использовании препарата «Сейбит П + БИРР + Fe». Расчет удельной концентрации протонов, нормированной по сырой биомассе корней, выявил повышение скорости выхода протонов во внешнюю среду под влиянием ЗСС 7 в 2 раза, а при использовании модифицированного препарата «Сейбит П + БИРР + Fe» – в 2,7 раза (табл. 2). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что предпосевная обработка семян ЗСС модифицирует состояние плазматических мембран клеток корней проростков пшеницы, вызывая увеличение их ацидофицирующей активности как в условиях нормального водоснабжения, так и при обезвоживании семян.

Как известно, одним из защитных механизмов, позволяющим поддерживать водный статус клеток в условиях засухи, является аккумуляция низкомолекулярных соединений. В условиях нормального водоснабжения водный потенциал клеток корня ниже водного потенциала почвенного раствора, что и обеспечивает поступление воды в корни, а при засухе водный потенциал клеток корня увеличивается и вода из клеток корня переходит в почвенный раствор, что вызывает дополнительное обезвоживание тканей. В данных условиях растению необходимо понизить свой водный потенциал, что достигается за счет аккумуляции в клетках неорганических ионов или

низкомолекулярных соединений. При накоплении такие соединения не только понижают водный потенциал клеток, восстанавливая водоснабжение, но и защищают ферменты от инактивации, обеспечивают целостность структурных белков, сохраняют функциональную активность клеточных мембран при стрессе. В связи с этим функциональная активность клеточных мембран может быть оценена по степени выхода в окружающую среду низкомолекулярных метаболитов нуклеотидного обмена. В литературе имеются сведения, что выход низкомолекулярных нуклеотидов из клеток незначителен в норме и резко усиливается под действием стрессовых факторов [8, 11].

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что предпосевная обработка семян ЗСС стимулировала выход свободных нуклеотидов при комнатной температуре (20 °С), как из отрезков листьев, так и из отрезков корней проростков пшеницы.

**Т а б л и ц а 3. Влияние предпосевной обработки семян на выход в окружающую среду компонентов нуклеотидного обмена из 7-дневных проростков яровой пшеницы Ростань в условиях нормального водоснабжения и при водном дефиците**

Вариант опыта	Листья				Корни			
	t 20 °С		t 50 °С		t 20 °С		t 50 °С	
	D 260, отн. ед.	%	D 260, отн. ед.	%	D 260, отн. ед.	%	D 260, отн. ед.	%
<i>Нормальное водоснабжение</i>								
Контроль	0,21±0,02	100,0	1,39±0,08	100,0	0,15±0,03	100,0	3,09±0,17	100,0
ЗСС 7	0,31±0,04	145,9	0,99±0,36	71,2	0,28±0,01	185,4	2,00±0,10	64,8
Сейбит П	0,31±0,02	149,5	0,91±0,12	65,1	0,50±0,06	324,4	1,93±0,37	62,3
Сейбит П+БИРР + Fe	0,39±0,03	184,3	0,83±0,12	59,7	0,54±0,07	353,5	0,79±0,12	25,5
<i>Водный дефицит</i>								
Контроль	0,39±0,07	100,0	0,86±0,12	100,0	0,18±0,04	100,0	1,02±0,20	100,0
ЗСС 7	0,46±0,11	117,2	0,61±0,11	70,7	0,35±0,03	188,7	0,51±0,03	50,3
Сейбит П	0,23±0,06	59,5	0,56±0,11	65,0	0,32±0,08	172,8	0,91±0,15	89,1
Сейбит П + БИРР + Fe	0,26±0,09	64,9	0,59±0,05	68,9	0,41±0,04	222,5	0,89±0,31	87,5

Причем стимуляция выхода низкомолекулярных метаболитов из клеток корней была выше, чем из клеток листовой пластинки, что может объясняться как структурно-функциональными особенностями клеточных мембран разных органов проростка, так и органоспецифичностью влияния предпосевной обработки семян на растительный организм. Наиболее выраженное влияние ЗСС на проницаемость мембран наблюдалось в варианте опыта с использованием препарата «Сейбит П + БИРР + Fe». Повышение температуры до 50 °С вызывало увеличение выхода свободных нуклеотидов из клеток листьев и корней как в контроле, так и в опыте. Однако у контрольных растений этот показатель возрастал в 6,5 раз в листьях и в 20,5 раза – в корнях. В вариантах опыта с использованием модифицированных ЗСС происходила относительная стабилизация клеточных мембран, что выражалось в снижении скорости выхода метаболитов в окружающую среду при повышенной температуре по сравнению с контролем. Так, относительный уровень вышедших из клеток в окружающую среду нуклеотидов составлял для листьев 59–70 %, а для корней – 25–65 % в вариантах опыта с использованием ЗСС по сравнению с необработанным контролем.

При воздействии стрессового фактора – водного дефицита (табл. 3) – в вариантах опыта с использованием ЗСС при комнатной температуре (20 °С) наблюдалось уменьшение выхода свободных нуклеотидов из клеток листьев при использовании препаратов на основе Сейбит П по сравнению с контролем, но увеличение – при использовании препарата ЗСС 7. Все изученные ЗСС способствовали снижению выхода свободных нуклеотидов из клеток корневой системы при комнатной температуре (20 °С). При повышенной температуре (50 °С) предпосевная обработка семян вызывала снижение выхода компонентов нуклеотидного обмена из отрезков листьев и корней в 1,4–1,5 и 1,2–2 раза соответственно, что свидетельствует о стабилизации мембран при повышенной температуре после действия водного дефицита.

**Заключение.** Ионный гомеостаз является важным компонентом в период адаптации клеток при стрессе, амплитуда изменений мембранных характеристик может свидетельствовать о том, что клетки активно противостоят воздействию. Проведенные исследования показали, что изу-

ченные защитно-стимулирующие составы (ЗСС) на основе модифицированных полимеров – сополимера акриламида с акрилатом натрия и мочевино-формальдегидной смолы – способствовали повышению активности амилаз в прорастающих семенах пшеницы после их высушивания-замачивания. Установлено, что комплексные пленкообразующие составы, использованные для обработки семян, оказывали влияние на структурно-функциональное состояние плазматических мембран, в результате чего возрастала активность протонных насосов корней при нормальном водоснабжении и после высушивания-замачивания семян. В условиях нормального водоснабжения предпосевная обработка семян ЗСС способствовала увеличению выхода компонентов нуклеотидного обмена из клеток листьев и корней 7-дневных проростков пшеницы при комнатной температуре. При повышенной температуре изученные препараты оказывали стабилизирующий эффект на плазматические мембраны клеток листьев и корней, который проявлялся и в условиях водного дефицита.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод об активизации метаболических процессов в зерновках пшеницы под действием пленкообразующих ЗСС в условиях обезвоживания, а также о модифицирующем влиянии изученных препаратов на структурно-функциональное состояние плазматических мембран проростков пшеницы, что создает теоретические предпосылки для их практического использования в адаптивных технологиях возделывания яровой пшеницы.

### Литература

1. Алексеева В. Я., Гордон Л. Х., Лосева Н. Л., Рахимова Г. Г. // Цитология. 2006. Т. 48, № 7. С. 569–577.
2. Воробьев Л. Н., Егорова Н. Н. // Энергетическая регуляция протондвижущей силы в корневой системе: Межвуз. сб. «Биохимия и биофизика транспорта веществ у растений». Горький, 1981. С. 61–67.
3. Генкель П. А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М., 1982.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М., 1985.
5. Кабашикова Л. Ф. Способ ранней диагностики эффективности многокомпонентных капсулирующих составов для обработки семян: методические указания. Мн., 2003.
6. Кабашикова Л. Ф., Деревинская А. А. // Наука и инновации. 2009. № 8. С. 46–50.
7. Кабашикова Л. Ф., Пишбытко Н. Л., Абрамчик Л. М. Методы оценки физиологического состояния растений в условиях засухи: Научно-методическое пособие. Мн., 2007.
8. Кузнецов В. В. Физиология растений: Учеб. для вузов. М., 2005.
9. Кушниренко М. Д. Физиология водообмена и засухоустойчивости растений. Кишинев, 1991.
10. Романов А. В. Эколого-физиологические аспекты предпосевной обработки семян фиторегуляторами и микроэлементами в агроценозе яровой пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2004.
11. Руденок А. Н. // Докл. АН СССР. 1973. Т. 4. С. 977–981.
12. Привалов Ф. И. Научно-практические рекомендации по внедрению интенсивных технологий возделывания зерновых культур. Могилев, 2010.
13. Привалов Ф. И. Подготовка к посеву семян зерновых культур (рекомендации). Жодино, 2008.
14. Пишбытко Н. Л. // Физиол. растен. 2004. Т. 51, № 1. С. 20–26.
15. Третьяков Н. Н. // Практикум по физиологии растений. М., 1990. С. 188–190.
16. Чайка М. Т. // Физиол. и биохим. культ. растен. 1995. Т. 27, № 1. 2. С. 77–85.

*A. A. DZERAVINSKAYA, L. F. KABASHNIKOVA*

#### **EFFECT OF PROTECTIVE AND STIMULATIVE PREPARATIONS ON PLASMA MEMBRANES OF SEEDLINGS AND AMYLASE ACTIVITY OF GERMINATING SEEDS OF WHEAT UNDER NORM AND WATER DEFICIT**

#### **Summary**

Influence of pre-seeding treatment of seeds by new protective and stimulating composition on physiological parameters of development of seedlings of a spring wheat is considered at normal water supply and in conditions of water deficiency. It is established, that application of film-forming compositions promoted: to increase of activity of proton pumps of roots, increase in an output of components of nucleotides metabolism from cells of leaves and roots of wheat seedlings at a room temperature, at the raised temperature the stabilizing effect of the studied preparations on plasmatic membranes of cells of leaves and roots was observed at normal water supply and in conditions of a water deficit. It is shown, that the studied protective and stimulating compositions under conditions of insufficient water supply promoted increase of activity amylase in sprouting seeds of wheat.