

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОРАСТАНИЯ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Ключевые слова: физиология растений, покой, зерна пшеницы, прорастание, пероксидаза.

Введение

Семена культурных растений, имея пониженную влажность (5-10%), в отсутствие воды находятся в состоянии вынужденного покоя. Однако данная форма покоя может проявляться и в семенах, готовых к прорастанию, находящихся в условиях отсутствия кислорода или при низкой температуре [1].

Оптимальными условиями для прорастания зерновок является достаточная их насыщенность водой (45-50%), обеспеченность атмосферным кислородом, необходимого для дыхания зерновок и благоприятной температуры среды, которая может колебаться, но в среднем должна быть равна 18-24°C [2]. Поэтому с возрастом оводненности в зерновках, при нормальных условиях, активируются основные метаболические процессы, возрастает дыхание до максимального уровня, которое может служить показателем их роста и развития.

Период прорастания зерновок пшеницы можно условно разделить на три этапа [3]: 1) набухание (активация метаболизма); 2) проклевывание (подготовка к началу роста зерновок за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); 3) рост проростка. Причем при прохождении начальных этапов прорастания каждый из выделенных факторов (температура, влажность, кислород) может ограничивать скорость роста и развитие проростка и индивидуальны для каждого вида зерновых культур.

Известно, что для нормального прорастания в воздушно-сухих семенах должны присутствовать все компоненты белок-синтезирующей системы: рибосомы, тРНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминоксил-тРНК-синтетазы, все ферменты метаболизма, белки теплового шока и их мРНК [4]. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окисли-

тельное повреждение тканей. В развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода. Накопление АФК в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран [5, 6]. Супероксидные радикалы модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества [7]. Поэтому исследования начальных этапов прорастания зерновок послужат основой для определения пригодности посевного зерна и позволят разработать критерии прогноза урожайности зерновых культур.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на зерновках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Омская 12, которые замачивали в дистиллированной воде в течение 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 23°C на свету в течение 7 сут., смачивая их дистиллированной водой (10 мл на чашку Петри). Количество зерновок в одной чашке – 100 шт. Опыты проводили в трех биологических повторностях (по 3-4 аналитических в каждой). Образцы для анализа отбирали в одно и то же время суток. Жизнеспособность зерновок пшеницы определяли по тетразольному методу [8]. Для УФ облучения зерновки с влажностью 5-6% в чашках Петри помещали под ртутнокварцевую лампу БНПО2-30-001У3,5, (Россия) с интенсивностью облучения 30 Вт/м², расположенной на расстоянии 25 см от зерен пшеницы. Анализ антиоксидантов (АО) проводили по методике [9]. К 0,2 мл супернатанта последовательно добавляли 0,2 мл 0,5%-ного о-фенантролина в 96%-ном этаноле и 0,2 мл 0,2%-ного FeCl₃ в 96%-ном этаноле. Затем объем доводили до 3 мл 96%-ным этанола и выдерживали 10 мин. в темноте. Определение антиоксидантов проводили по калибровочному графику, построенному для кверцетина. Количество антиоксидантов, содержащихся в проростках, рассчитывали в мг/100 г сухой массы [10]. Актив-

ность пероксидазы определяли при 22°C по начальной скорости окисления в их присутствии о-дианизидина перекисью водорода [11]. К 2,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 7,0) добавляли 0,2 мл раствора супернатанта и 0,1 мл 0,43 мМ раствора о-дианизидина в 96%-ном этаноле. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода. Увеличение поглощения раствора регистрировали при 460 нм ($\epsilon=30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [11]) для продукта окисления о-дианизидина, после быстрого перемешивания реагентов. За единицу активности фермента принимали количество о-дианизидина (мкмоль), окисленного за 1 мин. 1 г сухой массы. Спектрофотометрические исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S («Varian», США). В работе использовали этанол, очищенный перегонкой, о-дианизидин марки «ч.», очищенный возгонкой в вакууме, перекись водорода (30%-ный водный раствор) и антиоксиданты марки «о.ч.». Результаты обрабатывали статистически по Лакину [12]. При оценке достоверности использовали критерий Стьюдента при 5%-ном уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

Динамика набухания зерновок в лабораторных условиях, при их полном погружении в воду, описывается гиперболической зависимостью, на которой можно выделить три стадии: ускоренного, быстрого и медленного поступления воды в зерновку пшеницы (рис. 1). При этом наиболее активно при 23°C происходит набухание зародыша зерновки (рис. 2).

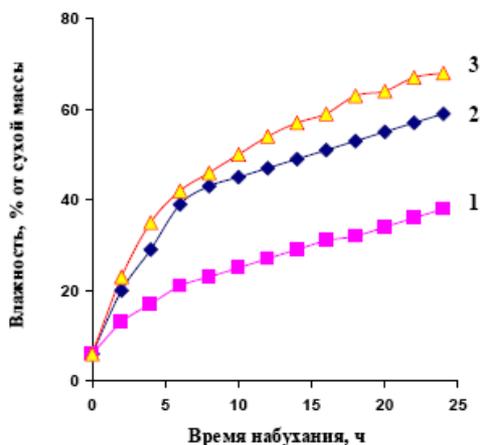


Рис. 1. Кривые набухания зерновок пшеницы сорта Омская 12 при температуре замачивания 5 (1), 23 (2) и 30°C (3) в дистиллированной воде

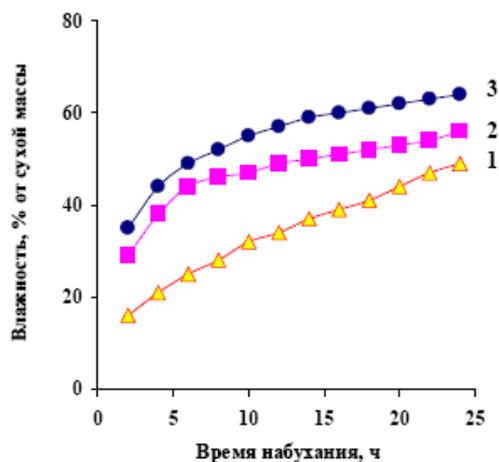


Рис. 2. Кривые набухания эндосперма (1), щитка (2) и части зародыша без щитка (3) пшеницы сорта Омская 12 при температуре 23°C в дистиллированной воде

На стадии ускоренного поглощения воды наблюдается активное поступление воды в зародыш семени, продолжающееся в течение 2-6 ч. Затем отмечается снижение поглотительной способности зерновки (стадия быстрого набухания), в этот период вода преимущественно поступает в эндосперм. Длительность этой стадии 6-16 ч. Оканчивается набухание стадией насыщения – 16-22 ч. Более длительное пребывание зерновок в воде может повлиять на дальнейшее их прорастание, обусловленное недостатком кислорода и подавлением дыхательной активности митохондрий. Как следует из таблицы, пребывание зерновок пшеницы в течение 1-4 суток в воде приводит к резкому понижению их всхожести до 9-22%. При этом в зернах отмечается повышение содержания АО в 1,7-2,2 раза, с одновременным снижением пероксидазной активности на 28-36%. Предварительное УФ-облучение семян пшеницы провоцирует в них протекание свободно-радикальных процессов, поэтому в ответ на действующий фактор в зернах содержание АО может возрастать в 2-3 раза, особенно это проявляется после 15 мин. УФ-облучения. Полученные данные свидетельствуют о том, что пероксидаза способна выполнять роль инициатора процессов прорастания семян, поскольку для углубления покоя семян требуется понижение пероксидазной активности, что, по видимому, достигается за счет увеличения содержания АО. Эти данные наглядно показывают взаимосвязь между пероксидазной активностью и содержанием АО при реализации механизмов формирования покоя семян.

Содержание АО, активность пероксидазы и всхожесть зерновок пшеницы в зависимости от времени их замачивания в воде (УФ-облучению подвергали зерновки с влажностью 5-8% перед их замачиванием в воде)

Фактор воздействия	АО, мкг/г влажной массы				ПО, мкмоль/мин. г влажной массы				Всхожесть, %			
	Время замачивания семян, сут.											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Контроль	32 (100)	41 (129)	43 (136)	65 (207)	1,63 (100)	1,69 (104)	1,17 (72)	1,17 (72)	74 (100)	71 (96)	44 (59)	10 (14)
УФ 15 мин.	29 (93)	38 (121)	50 (157)	95 (300)	1,63 (100)	1,52 (92)	1,22 (75)	1,14 (70)	85 (115)	66 (89)	31 (42)	14 (19)
УФ 60 мин.	36 (114)	34 (107)	61 (193)	63 (200)	1,46 (90)	1,63 (100)	1,52 (92)	1,08 (66)	81 (109)	66 (89)	36 (49)	14 (19)

В условиях насыщенности кислородом и благоприятной температуре в набухших зерновках активируются метаболические процессы в растягивающихся клетках. Этот этап называется проклевыванием (рис. 3). При этом проклюнувшимися считаются зерновки, у которых кончик зародышевого корешка прорвал плодовую оболочку (перикарп) [13]. Причем количество проклюнувшихся зерновок пшеницы зависит от температуры (рис. 4). Так, низкая (5°C) и высокая (30°C) температуры среды угнетают процесс проклевывания, тогда как замачивание зерновок пшеницы при температуре 20-23°C обуславливает их раннее проклевывание. После проклевывания начинается третий этап прорастания, сопровождаемый активным ростом побега и корней проростка (рис. 5).

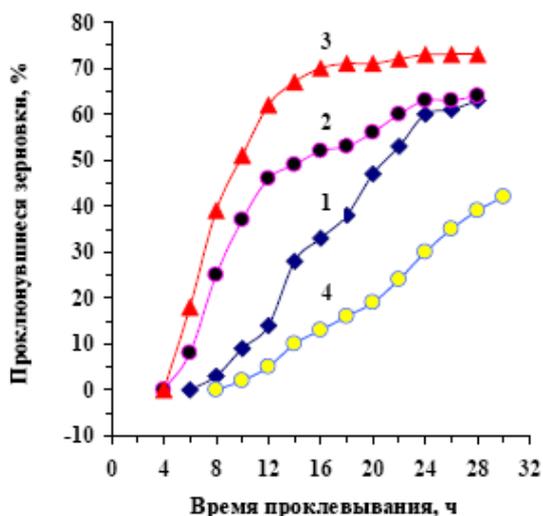


Рис. 3. Кривые проклевывания зерновок пшеницы сорта Омская 12 после 24 ч замачивания при 5 (1), 20 (2), 23 (3) и 30°C (4) в дистиллированной воде. Проклевывание зерновок исследовали при 23°C

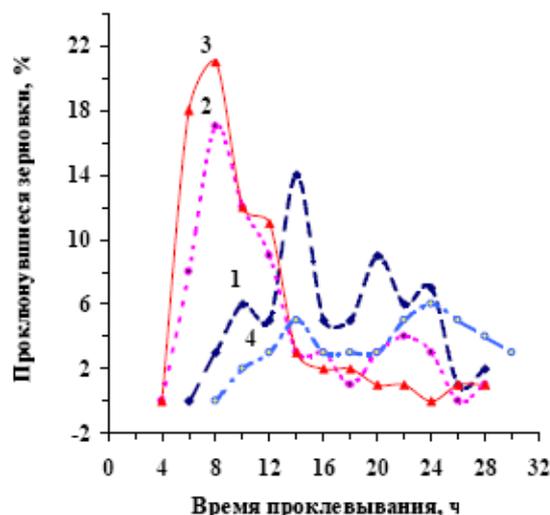


Рис. 4. Процент проклюнувшихся зерновок пшеницы сорта Омская 12 к определенному времени, после 24 ч замачивания зерен пшеницы при 5 (1), 20 (2), 23 (3) и 30°C (4) в дистиллированной воде. Проклевывание зерновок исследовали при 23°C

Нами была изучена активность пероксидазы на ранних этапах прорастания зерновок (рис. 6). На рисунке видно, что при прорастании зерновок с появлением корней и побегов резко возрастает активность пероксидазы в надземной части в 1,8-2,0 раза, в корнях – в 12-14, а в зерне – в 4-5 раз (рис. 6). Это свидетельствует о том, что пероксидаза участвует не только в поддержании жизнеспособности покоящихся зерновок, но и крайне необходима при их прорастании. В покоящихся зерновках пероксидаза катализирует реакции оксидантного и пероксидазного окисления различных соединений. При этом продуктом реакции является вода, которая крайне требуется зерновкам, находящимся в состоянии вынужденного покоя. Таким образом, в этих условиях пе-

роксидаза и другие оксидазы способны выполнять роль «водяной помпы», обеспечивая за счет этого зародыш зерновки водой.

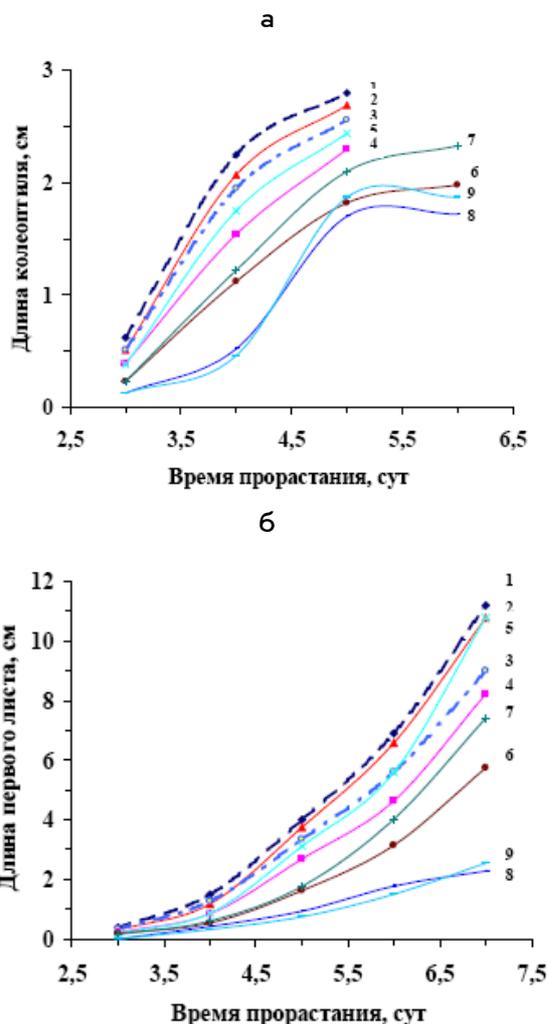


Рис. 5. Динамика роста coleoptilia (а) и первого листа (б) проростков пшеницы сорта Омская 12, зерновки которых проклюнулись в 6 (1), 8 (2), 10 (3), 12 (4), 14 (5), 16 (6), 18 (7), 20 (8) и 22 (9) ч после 24 ч набухания

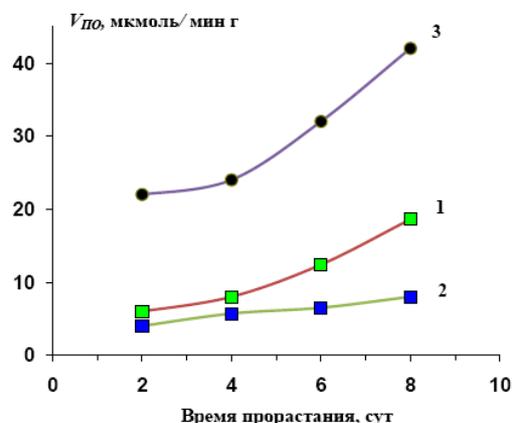


Рис. 6. Активность пероксидазы в зерновке (1), побеге (2) и корнях (3) проростков пшеницы, в зависимости от времени проращивания

Отклонения в нормальном росте проростков можно наблюдать после завершения этапа проклеивания, когда все зерновки можно разделить на две группы: непроросшие и проросшие проростки пшеницы. В группе непроросших присутствовали зерновки с уродливыми корешками и побегами или с их зачатками, а также отмечали проростки с отсутствующими корешками или побегами. Одним из объяснений приостановки роста проростков может быть несоответствие в развитии одной части проростка по отношению к другой. В группе непроросших можно выделить погибшие зерновки, у которых не полностью прокрашивался зародыш, а также зерновки, находящиеся в покое, у которых полностью прокрашивался зародыш, что служило свидетельством об их жизнеспособности.

Таким образом, нахождение зерновок в состоянии покоя является важным приспособительным механизмом сохранения вида. Данный признак достался семенам культурных растений от их дикорастущих предков, у которых способность семян находиться в состоянии органического покоя обеспечивает растениям возможность переносить неблагоприятные условия среды и позволяет создавать запас семян в почве [1].

После завершения проклеивания начинается этап активного роста корней и побега пшеницы. При этом растущие проростки можно условно разделить на четыре группы: активно растущие, замедляющие и ускоряющие рост, а также медленно растущие проростки пшеницы (рис. 7). У активно растущих проростков отмечается постоянный прирост в росте побега в течение всего периода наблюдений (3-7 суток), тогда как проростки с замедляющимся и ускоряющимся ростом побега представляют группу с нестабильным ростом.

При этом проростки с замедляющимся ростом побега вначале активно растут в течение 3-5 суток, а затем резко приостанавливают рост побега. У проростков с ускоряющимся ростом побега наоборот, вначале отмечается замедленный рост побега в течение 3-5 суток, а затем отмечается ускорение роста побега. Для медленно прорастающих проростков характерна задержка роста побега в первые 3-5 суток, а уж затем происходит

восстановление их активного роста. Неоднородность проростков в группе обусловлена нестабильностью роста проростков в этой группе.

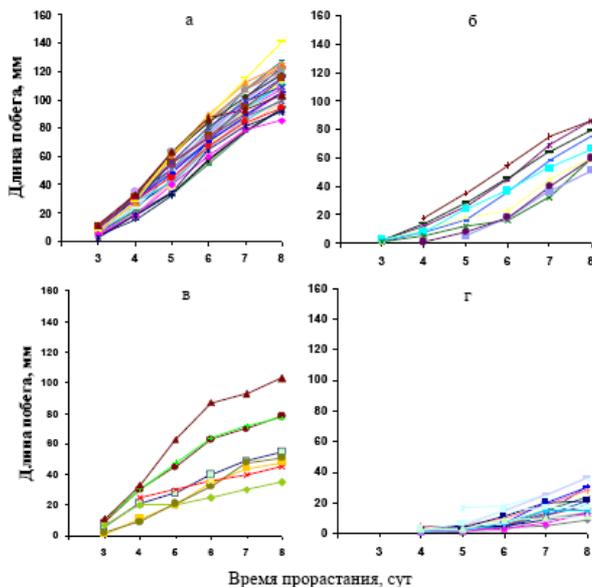


Рис. 7. Динамика прорастания проростков пшеницы сорта Омская 12 в зависимости от времени проращивания: активно растущие (а), ускоряющие рост (б), замедляющие (в) и медленно растущие (г)

Заключение

В заключении следует отметить, что формирование состояния покоя есть приспособительный признак, присущий зерновкам пшеницы, в реализации которого участвуют специализированные системы, способные обеспечивать их выживание в состоянии вынужденного покоя. При этом жизнеспособность зерновок поддерживается за счет активности компонентов антиоксидантной системы. Ведущим звеном этой системы является пероксидаза, активность которой резко возрастает в процессе прорастания зерновок, тогда как в условиях искусственного гипобиоза, вызванного длительным затоплением зерновок в воде, у них также отмечается увеличение содержания антиоксидантов, сопровождающееся понижением активности пероксидазы. Таким образом, между пероксидазой и антиоксидантами наблюдается взаимосвязь, которая обусловлена тем, что пероксидаза способна осуществлять контроль за уровнем перекиси, восстанавливая ее до воды, окисляя низкомолекулярные антиоксиданты. При этом высокие концентрации антиоксидантов подавляют активность фермента.

Выявленные особенности в прорастании зерновок пшеницы позволят в дальнейшем разобраться в механизмах прораста-

ния и предложить методы и способы повышения продуктивности зерновых культур.

Библиографический список

1. Николаева М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М.Г. Николаева, М.В. Разумова, В.Н. Гладкова. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
2. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н.Н. Третьяков, Е.Н. Кошкин, Н.М. Макрушин и др.; под ред. Н.Н. Третьякова. – М.: Колос, 1998. – 640 с.
3. Обручева Н.В. Физиология инициации прорастания семян / Н.В. Обручева, О.В. Антипина // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – № 2. – С. 287-302.
4. Гумилевская Н.А. Синтез белка и РНК в прорастающих семенах / Н.А. Гумилевская, Л.В. Чумикина, В.Р. Шатилова // Биохимия. – 1995. – Т. 60. – № 1. – С. 35-45.
5. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
6. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова, А.В. Алесенко, Е.М. Молочкина, Н.М. Пальмина, Н.Г. Храпова. – М.: Наука, 1975. – 241 с.
7. Коган А.Х. Свободно-радикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда / А.Х. Коган, А.Н. Кудрин, Л.В. Кактурский, Н.И. Лосев // Патофизиология и экспериментальная терапия. – 1992. – № 2. – С. 5-15.
8. Жизнеспособность семян / под ред. М.К. Фирсовой. – М.: Колос, 1975. – 415 с.
9. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
10. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2006. – 256 с.
11. Лебедева О.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена / О.В. Лебедева, Н.Н. Угарова, И.В. Березин // Биохимия. – 1977. – Т. 42. – № 8. – С. 1372-1379.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая шк., 1990. – 352 с.
13. Обручева Н.В. Общность физиологических механизмов подготовки к прорастанию у семян с различным типом покоя / Н.В. Обручева, О.В. Антипова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 3. – С. 426-431.