

# **ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА АМИЛОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЯЧМЕНЯ**

**Введение.** Наличие в растительной клетке эндогенной системы координации и саморегуляции является основой для управления ими с помощью различных экзогенных регуляторных комплексов, среди которых важная роль отводится использованию физиологически активных веществ. Экзогенные физиологи-

чески активные соединения затрагивают генный и гормональный уровни регуляции, оказывая существенное влияние на многие реакции обмена веществ, и, в зависимости от генотипа, степень изменения указанных процессов различна [1]. В настоящее время большое внимание уделяется новой группе фитогормонов, получившей название “брассиностероиды” [2]. Однако в литературе представлено недостаточно данных о влиянии различных по структуре производных брассинолида на начальные этапы онтогенеза, в частности, на прорастание семян и связанный с этим процессом гидролиз запасных веществ [3, 4]. Поэтому целью наших исследований явилось изучение влияния ростстимулирующих препаратов на активность амилаз – ключевых ферментов гидролиза крахмала – одного из важных запасных веществ семян злаковых культур.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили изоплазматические линии ячменя Роланд (Зазерский), Зазерский (Роланд) и исходные сорта – доноры их ядра и цитоплазмы – Роланд, Зазерский 85 с целью выявления роли ядра и цитоплазмы в направленности действия физиологически активных веществ на активность  $\alpha$ -амилазы и  $\beta$ -амилазы в прорастающих семенах ячменя.

В качестве фиторегуляторов использовали эпибрассинолид [ЭБ] и гомобрассинолид [ГБ] – препараты гормонального типа – в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}\%$  [2]. Для модельных лабораторных опытов семена ячменя обрабатывали регуляторами роста способом инкрустации с добавлением 1% NaKMЦ. Обработанные семена прорастивали в чашках Петри, содержащих два слоя фильтровальной бумаги, на дистиллированной воде при  $20-22^{\circ}\text{C}$  [5]. Контролем служили семена, обработанные водой. Определение активности амилаз проводили на фотоэлектроколориметре по методу [6] после 6, 24, 48, 72 часов прорастания зерновок в термостате и через два часа после выставления трехдневных этиолированных проростков на свет (74 часа от момента закладки опыта). Активность амилаз выражали в мкг гидролизованного крахмала на 1 г проростков за минуту. Результаты обработаны статистически и представлены в виде  $M \pm m$ .

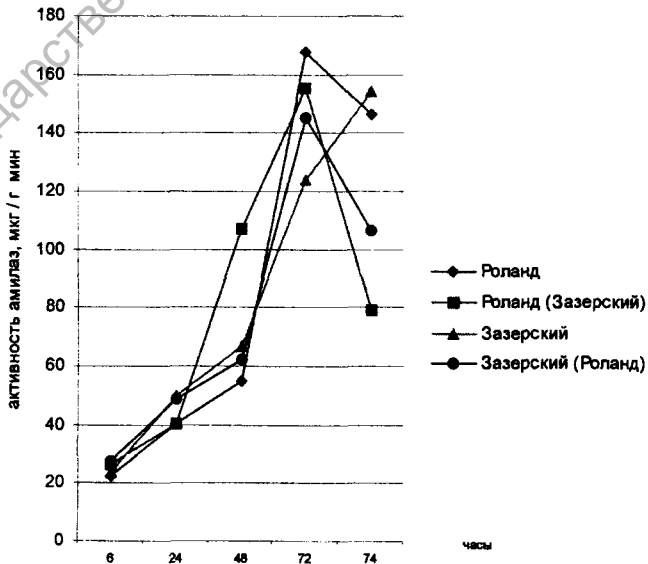


Рис. 1. Изменение активности амилаз при прорастании семян различных генотипов ячменя

**Результаты и их обсуждение.** Изучаемые генотипы ячменя характеризуются различной стартовой активностью амилаз и их динамикой при прорастании зерновок (рис. 1). На начальных этапах ферментативная активность возрастает пропорционально продолжительности проращивания семян. Наибольшее увеличение суммарной активности ферментов у изолинии Роланд (Зазерский) происходило на второй день от момента закладки опыта, а у всех остальных генотипов – на третий день. Следует отметить, что через два часа после выставления проростков на свет активность амилаз у всех сортов, за исключением Зазерского, снижалась.

Суммарная ферментативная активность обусловлена активностью  $\alpha$ -амилазы и  $\beta$ -амилазы [7]. По мере прорастания семян соотношение активностей данных ферментов значительно изменяется (табл. 1). В течение 48 часов активность  $\beta$ -амилазы превышала активность  $\alpha$ -амилазы, за исключением сорта Роланд, где соотношение активностей составляет 156,3% через 2 суток от закладки опыта. При дальнейшем прорастании семян активность  $\alpha$ -амилазы на 3,8-182,1% превышала активность другого гидролитического фермента в зависимости от генотипа. Увеличение активности  $\alpha$ -амилазы во времени происходит значительно быстрее, чем  $\beta$ -амилазы, хотя в первые 24 часа обнаружено лишь незначительное количество данного фермента.

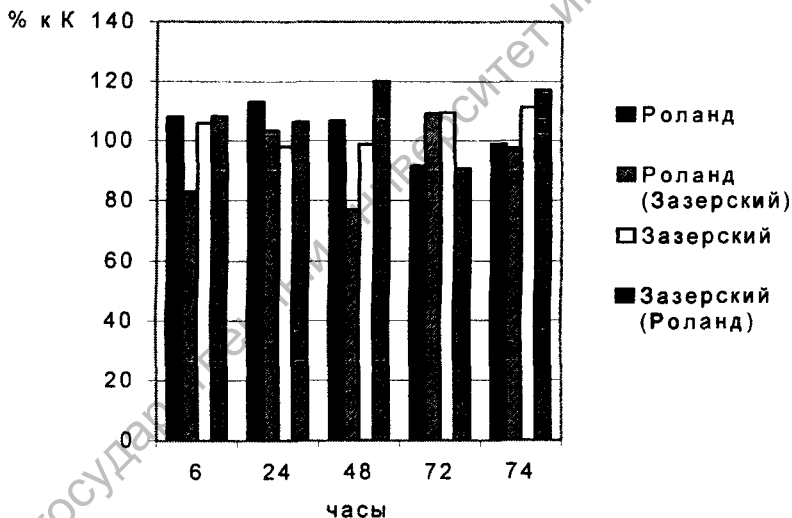


Рис. 2. Влияние зибрассинолида на активность амилаз в семенах различных генотипов ячменя

Физиологически активные вещества оказывают заметное влияние на изменение активности амилаз при прорастании семян. Под влиянием *зибрассинолида* у всех изучаемых генотипов ячменя, за исключением линии Роланд (Зазерский), отмечалось увеличение амилазной активности ферментов в фазу активации (через 6 часов), когда начинают действовать все механизмы, обеспечивающие зародышу начало роста (рис. 2) [8]. Заметное увеличение активности амилаз отмечалось и в момент прободения корешком оболочки семени через 24 часа от момента закладки опыта: она на 3,4-13,1% превысила контрольный вариант, за исключением семян сорта Зазерский. Дальнейшее проращивание семян показало, что через 48 часов только ячмень сорта Роланд и линия с его цитоплазмой характеризовались большей, чем в контроле, амилазной активностью. Однако в момент интенсивного роста проростков наблюдалась совсем иная картина: у ячменя сорта Роланд и линии с его цитоплазмой проис-

ходило существенное снижение активности ферментов, а у двух других генотипов – ее увеличение. После выставления трехдневных проростков на свет усиление амилалитической активности по сравнению с контрольным вариантом отмечалось у генотипов Зазерский и Зазерский (Роланд). Таким образом, стимулирующее влияние препарата на ячмень сорта Роланд проявлялось на ранних этапах прорастания – до прободения колеоптилем семенной оболочки, а на сорт Зазерский – на самом раннем и поздних этапах прорастания. Полученные результаты дают основание предположить, что увеличение ферментативной активности под влиянием данного фиторегулятора контролируется как ядерным, так и цитоплазматическим геномами, хотя у сорта Роланд активация цитоплазматического генома является большей, чем ядерного.

Таблица 1

Активность  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы (мкг гидр. крахмала / г проростков · мин) в семенах различных генотипов ячменя.

Генотип	Часы				
	6	24	48	72	74
<b><math>\alpha</math>-амилаза</b>					
Роланд	0,6 ± 0,05	1,2 ± 0,1	33,6 ± 1,3	85,5 ± 1,1	75,4 ± 2,8
Роланд (Зазерский)	0,3 ± 0,01	1,0 ± 0,08	26,5 ± 1,9	108,5 ± 2,4	74,8 ± 1,4
Зазерский	0,3 ± 0,02	3,0 ± 0,2	18,7 ± 1,7	63,3 ± 2,3	89,9 ± 1,2
Зазерский (Роланд)	0,6 ± 0,05	1,4 ± 0,1	21,5 ± 0,8	107,1 ± 3,2	78,0 ± 1,2
<b><math>\beta</math>-амилаза</b>					
Роланд	21,6 ± 1,1	39,4 ± 3,5	21,5 ± 1,8	82,4 ± 2,9	71,0 ± 1,5
Роланд (Зазерский)	26,0 ± 4,5	39,6 ± 4,2	80,4 ± 0,2	46,6 ± 1,2	4,5 ± 0,1
Зазерский	23,0 ± 2,0	46,7 ± 0,4	48,3 ± 0,8	60,8 ± 0,2	61,3 ± 1,3
Зазерский (Роланд)	26,6 ± 2,3	47,2 ± 2,7	40,8 ± 1,1	38,4 ± 1,3	28,7 ± 1,0

Увеличение ферментативной активности в семенах всех генотипов ячменя, за исключением изолинии Роланд (Зазерский), происходит за счет увеличения активности как  $\alpha$ -амилазы, так и  $\beta$ -амилазы (табл. 2). Линия с ядром сорта Роланд характеризуется увеличением активности преимущественно  $\beta$ -амилазы.

Гомобрассинолид оказывал несколько иное влияние на амилалитическую активность ферментов. В течение 24 часов проращивания семян восприимчивым к действию данного фиторегулятора оказался лишь ячмень сорта Роланд: увеличение активности амилаз происходило на 6,2-18,5% по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3). Через 48 часов от начала проращивания фиторегулятор оказывал стимулирующее действие на генотипы Роланд и Зазерский (Роланд), а через 72 часа – только на изоплазматические линии. После выставления трехдневных этилированных проростков на свет повышенная суммарная активность изучаемых ферментов отмечена у сорта Роланд и линии с его цитоплазмой. Следует отметить, что сорт Зазерский не отзывчив на предпосевную обработку семян на начальных этапах развития. Исходя из полученных результатов, мы можем предположить, что изменение ферментативной активности под влиянием ГБ контролируется ядерным и, в большей степени, цитоплазматическим геномами.

Изменение суммарной активности ферментов по сравнению с контролем происходит за счет изменения соотношения активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы. У изоплазматической линии Зазерский (Роланд) увеличение амилалитической актив-

ности происходит за счет увеличения активности обоих ферментов, но в большей степени – β-амилазы (см. табл. 2). Следует отметить, что у невосприимчивого к действию данного фиторегулятора сорта Зазерский может происходить увеличение активности и α-, и β-амилазы. Но так как активность другого фермента в этот момент будет ниже, чем в контроле, то суммарная активность амилаз в опытном варианте меньше, чем в контрольном.

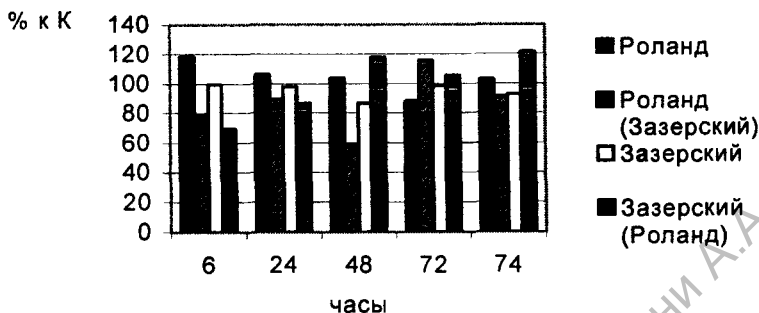


Рис. 3. Влияние гомобрасинолида на активность амилаз в семенах различных генотипов ячменя

Таблица 2

**Влияние регуляторов роста на активность α- и β-амилазы (мкг гидр. крахмала / г проростков · мин) в семенах различных генотипов ячменя**

Генотип	Вариант	Часы				
		6	24	48	72	74
<b>α-амилаза</b>						
Роланд	ЭБ	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	29,2 ± 1,7	91,3 ± 2,4	88,1 ± 0,9
	ГБ	0,9 ± 0,1	4,1 ± 0,8	36,5 ± 1,2	74,9 ± 1,3	85,7 ± 2,6
Роланд (Зазерский)	ЭБ	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	22,7 ± 3,2	112,0 ± 5,6	69,7 ± 0,1
	ГБ	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	43,9 ± 2,4	123,5 ± 2,9	68,7 ± 2,1
Зазерский	ЭБ	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,04	23,4 ± 2,1	73,6 ± 6,0	90,9 ± 2,5
	ГБ	0,1 ± 0,01	0,4 ± 0,04	21,9 ± 2,3	64,7 ± 1,9	71,3 ± 2,
Зазерский (Роланд)	ЭБ	0,1 ± 0,01	1,3 ± 0,06	27,7 ± 0,1	104,9 ± 2,7	78,4 ± 2,2
	ГБ	0,1 ± 0,01	1,1 ± 0,06	28,8 ± 0,5	101,4 ± 2,7	81,3 ± 1,4
<b>β-амилаза</b>						
Роланд	ЭБ	23,3 ± 0,4	45,1 ± 3,9	29,6 ± 0,7	62,7 ± 0,2	56,9 ± 0,4
	ГБ	25,4 ± 0,8	39,0 ± 3,1	20,7 ± 0,8	73,1 ± 0,9	65,0 ± 0,1
Роланд (Зазерский)	ЭБ	21,3 ± 2,3	41,4 ± 0,4	59,7 ± 0,3	57,4 ± 0,9	7,7 ± 0,2
	ГБ	20,3 ± 0,6	35,8 ± 0,5	18,3 ± 1,3	55,9 ± 0,6	3,5 ± 0,4
Зазерский	ЭБ	24,4 ± 0,6	48,3 ± 1,2	42,8 ± 2,4	62,4 ± 0,8	77,6 ± 2,7
	ГБ	23,1 ± 0,8	48,3 ± 1,2	36,1 ± 0,6	57,6 ± 0,7	68,8 ± 2,9
Зазерский (Роланд)	ЭБ	28,5 ± 3,9	50,4 ± 2,4	47,2 ± 3,1	27,0 ± 0,1	46,6 ± 0,3
	ГБ	18,8 ± 2,7	41,0 ± 1,2	44,6 ± 0,8	52,4 ± 2,1	48,4 ± 3,3

Таким образом, при использовании регуляторов роста гормонального типа необходимо учитывать не только природу препаратов, но и особенности их действия, а также геном растений.

**Заключение.** Изучаемые генотипы ячменя характеризуются различной стартовой активностью α-амилазы и β-амилазы и их динамикой при прорастании семян. Различные брассиностероиды оказывают неодинаковое влияние на активность ферментов и распад запасных веществ во времени. Стимулирующее действие ЭБ проявлялось до прободения колеоптилем оболочки семени – в те-

чение 48 ч от момента закладки опыта. Увеличение амилолитической активности под влиянием фиторегуляторов в течение 48 часов в большей степени происходило у сорта Роланд, а при дальнейшем росте проростков – у сорта Зазерский. Сорт Роланд отзывчив на обработку ГБ практически на всех начальных этапах роста проростка, а Зазерский – ни на одном из них. Следует отметить, что у чувствительного сорта Роланд происходят более существенные колебания активности амилаз, чем у более устойчивого Зазерского.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Деева В.П.** Физиолого-генетические основы регуляции роста и развития растений с помощью физиологически активных веществ // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы Междунар. науч. конф. – Мн., 1999. – С. 3-5.
2. **Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н.** Брассиностероиды. – Мн.: Наука і тэхніка, 1993. – 287 с.
3. **Чижова С.И., Голанцева Е.Н., Прусакова Л.Д.** Влияние эпибрассинолида на активность альфа-амилазы и всхожесть семян яровой пшеницы // 4-й Съезд физиологов растений России: Тез. докл. Т. 2. – М., 1999. – С. 733-734.
4. **Прусакова Л.Д., Чижова С.И., Павлова В.В.** Оценка ретардантной активности триазолов в  $\alpha$ -амилазном биотесте на эндосперме ярового ячменя // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – № 4. – С. 626-630.
5. **Nilufa Sultana, Takeshi Ikeda and Toshiaki Mitsui.** GA<sub>3</sub> and Proline Promote Germination of Wheat Seeds by Stimulating  $\alpha$ -Amylase at Unfavorable Temperatures // Plant Prod. Sci. – 2000. – 3 (3). – P. 232-237.
6. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
7. **Даффус К., Даффус Дж.** Углеводный обмен растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – 176 с.
8. **Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.** Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наукова думка, 1964. – 388 с.

#### SUMMARY

*The influence of plant growth regulators – epibrassinolide and homobrassinolid – on changing the activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases during seeds germination of two grades of barley and their isoplasmatic lines is shown. Epibrassinolide increased the activity of enzymes during 48 hours. Homobrassinolid increased the activity of amylases in Roland grade during all the experiment, Zazersky grade being not susceptible to treatment of this compound. The more sensitive grade of Roland proved to vary the enzyme activity in a wider range that of Zazersky.*