

УДК 633.16:581.1:584.19

UDC 633.16:581.1:584.19

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ГОДА РЕПРОДУКЦИИ СЕМЯН НА РАЗВИТИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ**SEED GROWTH PERIOD ENVIRONMENT OF SPRING BARLEY INFLUENCE TO THE DEVELOPMENT OF AMYLASE ACTIVITY DURING IT'S GERMINATION**

Игнатенко Инна Сергеевна
аспирантка
*Азово-Черноморская государственная
агроинженерная академия, Зерноград, Россия*

Ignatenko Inna Sergeevna
postgraduate student
*Azov-Black Sea State Agro-Engineering Academy,
Zernograd, Russia*

Впервые дана характеристика изменения активности α - и β -амилаз, а также общей амилолитической активности по микрофенологическим фазам прорастающего семени ярового ячменя в условиях оптимального увлажнения в зависимости от условий года репродукции семян

The dynamics of α -, β -amylase and summing amylase activity of single germinating spring barley seed is presented for the first time. It has been shown, that the environment of seed growth period influences the development of ferments' activity

Ключевые слова: ЯЧМЕНЬ, ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН, АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, УСЛОВИЯ ГОДА РЕПРОДУКЦИИ СЕМЯН

Keywords: BARLEY, SEED GERMINATION, AMYLASE ACTIVITY, ENVIRONMENT DURING SEED GROWTH PERIOD

Сухие семена быстро поглощают воду, набухают и начинают прорастать. Характер и интенсивность физиологических процессов, протекающих в прорастающих семенах, зависят от активности ферментативного комплекса зерна и от условий окружающей среды. Главная особенность прорастания и его общая биохимическая направленность- распад в эндосперме и семядолях высокомолекулярных веществ до растворимых низкомолекулярных при участии влаги и под действием ферментов, прежде всего, ферментов амилолитического комплекса с высокой активностью α -амилазы [5]. В сухом семени ферменты частично находятся в эндосперме или зародыше в связанном, неактивном состоянии и при влиянии набухания переходят в активное состояние [9]. При прорастании семян под влиянием амилазы крахмал в эндосперме зерновки переводится в декстрины и мальтозу, а затем мальтоза под влиянием фермента мальтазы расщепляется до глюкозы. Одновременно с накоплением глюкозы идет образование сахарозы, которая используется растущим проростком [6].

Гидролиз крахмала в зерновках ячменя важен при его использовании для пивоварения. Качество солода зависит от жизнеспособности зародышей (и от синтеза гибберелловой кислоты): чем ниже всхожесть, тем хуже солод [1].

Изучение амилазной активности проводят, как правило, на определенный день прорастания семян [2, 10]. Так, было показано, что максимум активности суммарных амилаз зерновой массы в процессе прорастания семян пшеницы обычно проходит на 3...6-й день. При таком подходе в одну пробу попадают семена, находящиеся на разных этапах прорастания либо вовсе невсхожие, что не дает возможности оценить нарастание активности фермента в одном семени. Для получения общего представления об активности ферментов и для производственных целей такой подход, возможно, и оправдан, но для проведения фундаментальных исследований физиологии и биохимии прорастания семян, а также для сравнения сортов в селекции и партий семян в семеноводстве необходимо проводить изучение не по дням, а по фазам прорастания семян. На кафедре физиологии и химии разработана усовершенствованная шкала микрофенологических фаз прорастания семян (МФФ ПС) ячменя [4]. В этой шкале, кроме известных в настоящее время фаз, представлены также МФФ, описывающие этапы роста и развития корневой системы проростка. Использование в исследованиях данного подхода даёт возможность зафиксировать изменение активности α - и β -амилаз по МФФ ПС и трактовать полученные результаты применительно к отдельному семени. Применение оценки семян по МФФ ПС позволило нам выявить стимулирующий характер предобработки семян физическим фактором при проращивании в условиях пониженной температуры, который проявляется в синхронизации прорастания семян [3]. Однако до сих пор не была представлена полная картина изменения амилолитической активности в

прорастающем индивидуальном семени ярового ячменя разных сортов в зависимости от условий года репродукции семян.

Целью настоящей работы было изучение влияния условий года репродукции семян на амилолитическую активность в прорастающем семени ярового ячменя различных сортов.

Методика. Объектом исследования служили семена трех сортов ярового ячменя Мамлюк, Ратник и Зерноградец 770, которые внесены в реестр селекционных достижений и допущены к использованию в Северо-Кавказском регионе. Анализ провели на семенах трех лет репродукции – 2007г. – острозасушливого (семена-07), 2008г. – умеренно-засушливого (семена-08), 2009г. – оптимального (семена-09) по гидротермическому режиму. Семена проращивали в растильнях на фильтровальной бумаге в дистиллированной воде при температуре +20⁰С согласно ГОСТу [8]. В анализ отбирали семена, находящиеся на одной МФФ ПС [3]. Суммарную амилолитическую активность, а также активность α - и β -амилаз определяли стандартным методом [7]. Активность ферментов выражали в мг гидролизованного крахмала за 1 час на 1 мл ферментного препарата. Биологическая повторность опытов 2-кратная, аналитическая - 4-кратная. Каждый опыт повторяли дважды. Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием программ Excel ПК.

Результаты и обсуждение. Характер изменения активности амилолитических ферментов в процессе прорастания семян ярового ячменя имеет общие закономерности, однако проявляются и количественные отличия, как между сортами, так и между семенами разных лет репродукции. В связи с тем, что в процессе прорастания семени его влажность резко возрастает, мы выражали полученные данные активности ферментов на абсолютно-сухое вещество.

Суммарная активность амилазы в прорастающем семени трех сортов ярового ячменя представлена на рисунке 1. Самая низкая

активность фиксируется у сортов Зерноградец 770 и Ратник в семенах-07, а у сорта Мамлюк - в семенах-08. Наибольшая суммарная активность амилазы регистрируется у сорта Зерноградец 770 в семенах-08, а у сортов Мамлюк и

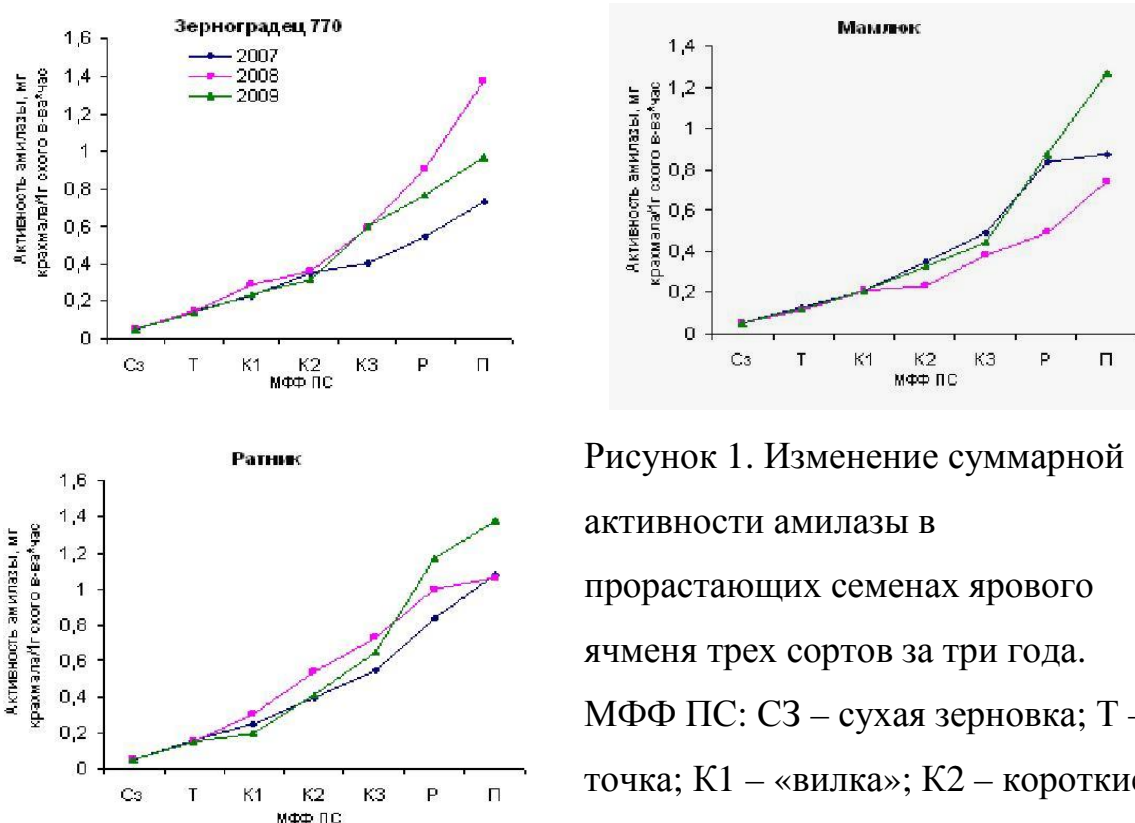


Рисунок 1. Изменение суммарной активности амилазы в прорастающих семенах ярового ячменя трех сортов за три года. МФФ ПС: Сз – сухая зерновка; Т – точка; К1 – «вилка»; К2 – короткие корешки; К3 – длинные корешки; Р – росток; П – проросток.

Ратник - в семенах-09. Отмеченные различия активности отчетливо наблюдаются на графике, начиная с разных МФФ ПС у разных сортов. Так, у сортов Зерноградец 770 и Ратник различия в амилолитической активности по годам репродукции семян регистрируются с фазы «точка» (Т), а у сорта Мамлюк - только с фазы «вилка» (К1).

Активность α -амилазы по МФФ ПС представлена на рисунке 2. Установлено, что в сухих семенах ярового ячменя сортов Зерноградец 770, Мамлюк, Ратник трёх лет репродукции α -амилаза отсутствует – это согласуется с данными других авторов [6,10]. Мы показали, что она

отсутствует и в наклюнувшихся семенах и появляется только в фазе «вилка» (K1), когда зародышевый корешок прорывает колеоризу. По форме кривой и положению максимума можно судить о ходе изменения активности α -амилазы при прорастании. Полученные экспериментальные кривые изменения активности α -амилазы у сорта Ратник имеют классическую S-образную кривую, что отражает неравномерность данного процесса в ходе прорастания семян при постоянных внешних условиях и носит общебиологический характер. Самая низкая активность α -амилазы фиксируется у сортов Зерноградец 770 и Ратник в семенах-07, а у сорта Мамлюк в семенах-08. Высокая активность отмечалась у сортов Мамлюк и Ратник в семенах-09, а у сорта Зерноградец 770 – в семенах-08. Различия в ходе кривых на графиках активности фермента в семенах сорта Зерноградец 770 начинается с фазы K2, а у сортов Мамлюк и Ратник - с фазы K1.

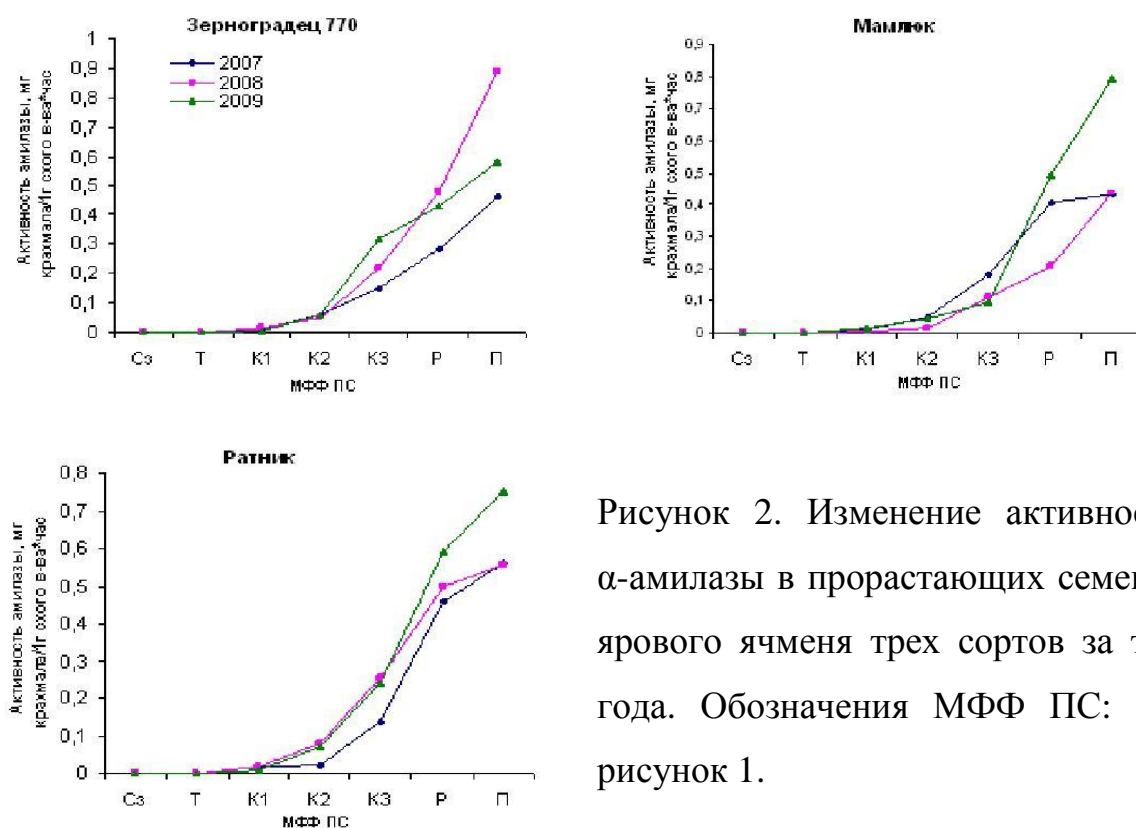


Рисунок 2. Изменение активности α -амилазы в прорастающих семенах ярового ячменя трех сортов за три года. Обозначения МФФ ПС: см. рисунок 1.

β-амилаза в сухих семенах находится в активной форме, что дает возможность на начальных этапах прорастания семян снабжать зародыш семени субстратом для получения энергии до запуска синтеза *α*-амилазы *de novo*. Активность *β*-амилазы в процессе прорастания семян возрастает (рис. 3). Наибольшая активность *β*-амилазы у сортов Зерноградец 770 и Ратник наблюдалась в семенах-08, а наименьшая активность у этих же сортов регистрировала в семенах-07. У сорта Мамлюк низкая активность *β*-амилазы отмечалась в семенах-08, а в семенах-07 и -09 активность этого фермента находила практически на одном уровне. Различия в ходе кривых на графиках активности фермента в семенах сортов Зерноградец 770 и Ратник начинается с фазы Т, а у сорта Мамлюк - с фазы К1.

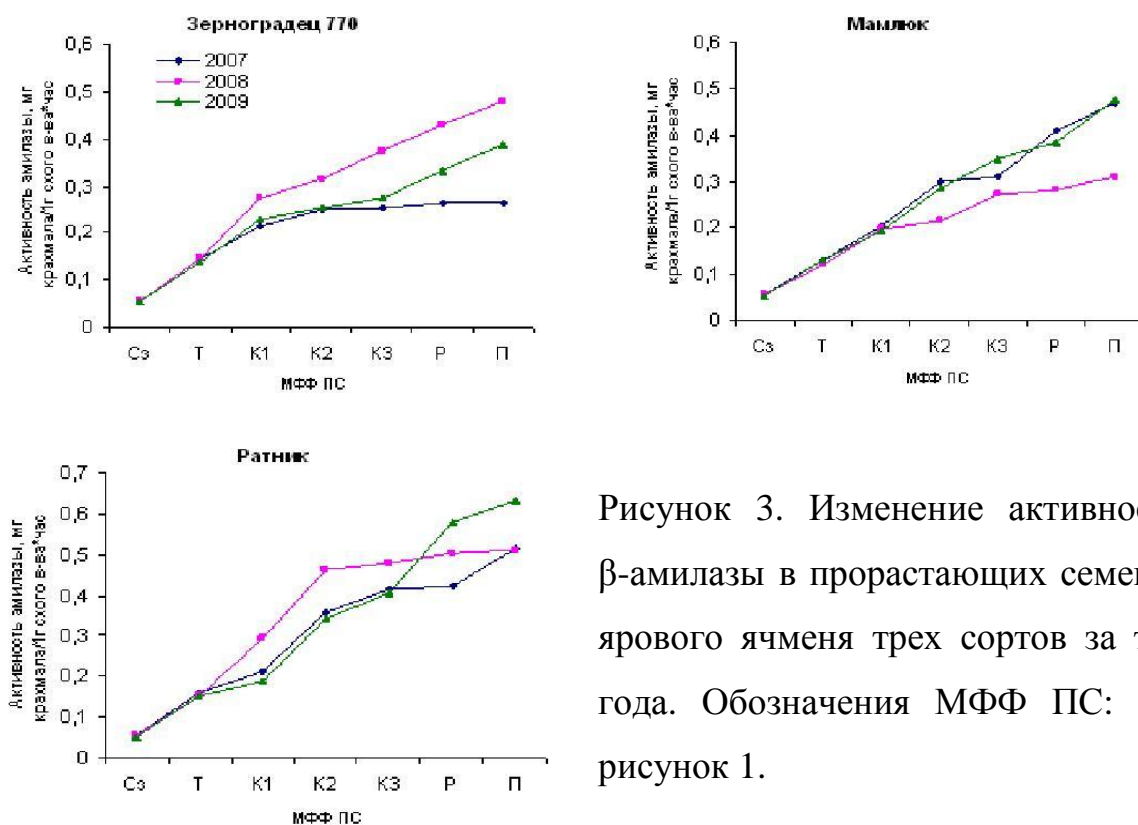


Рисунок 3. Изменение активности β -амилазы в прорастающих семенах ярового ячменя трех сортов за три года. Обозначения МФФ ПС: см. рисунок 1.

Увеличение активности α - и β -амилазы в семени за весь период его прорастания мы определили по соотношению активности в микрофенофазах «проросток : К1» для α -амилазы и «проросток : сухое

зерно» для β -амилазы в среднем по трём сортам за каждый год репродукции семян (таблица 1).

Таблица 1 - Увеличение активности α - и β -амилазы за период прорастания семени ярового ячменя в зависимости от условий года репродукции семян (среднее по трём сорта). Обозначения МФФ ПС: см. рисунок 1.

Год	Увеличение активности амилолитических ферментов за период прорастания семени	
	α -амилаза: за период «К1-проросток»	β -амилаза: за период «С3-проросток»
2007	41,7	7,5
2008	47,2	7,9
2009	47,8	9,2
среднее	45,6	8,2

Принципиальные отличия условий года выращивания семян в увеличении активности ферментов не выявлены. Несколько меньшие значения активности были установлены для семян-07 (острозасушливый год). Однако возрастание активности между ферментами существенно отличается. Активность α -амилазы в среднем по годам возрастает в 45,6 раза, а активность β -амилазы – только в 8,2 раза.

Варьирование активности амилолитических ферментов по МФФ ПС семени ярового ячменя в зависимости от года выращивания семян представлено в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние года репродукции семян ярового ячменя на варьирование активности амилолитических ферментов в индивидуальном семени по МФФ при их проращивании в условиях оптимального увлажнения (среднее по трём сортам). Обозначения МФФ ПС – см. рис.1.

Год	Коэффициент вариации активности ферментов по МФФ ПС, %						
	суммарная амилолитическая активность						
	С3	Т	К1	К2	К3	Р	П

2007	1,0	9,8	8,1	3,9	15,4	22,6	19,6
2008	2,8	12,5	19,4	41,1	34,4	33,7	29,4
2009	1,9	8,1	9,2	14,7	18,3	22,3	17,6
среднее	1,9	10,1	12,2	19,9	22,7	26,2	22,2
α-амилаза							
	СЗ	Т	К1	К2	К3	Р	П
2007	-	-	28,8	44,9	15,0	23,9	16,5
2008	-	-	44,5	65,7	38,9	41,0	37,6
2009	-	-	57,9	25,1	51,6	15,9	15,8
среднее	-	-	43,7	45,2	35,2	27,0	23,3
β-амилаза							
	СЗ	Т	К1	К2	К3	Р	П
2007	1,0	9,8	3,0	18,4	25,1	24,2	31,9
2008	2,8	12,5	19,5	37,6	27,4	27,4	25,1
2009	1,9	8,1	10,4	15,3	19,3	30,0	24,7
среднее	1,9	10,1	11,0	23,8	24,0	27,2	27,2

Значения коэффициента вариации активности α-амилазы имеют максимальные значения в МФФ К1 и К2, а затем снижаются. Это свидетельствует о том, что условия года формирования семян влияют на систему активизации синтеза α-амилазы в клетках алейронового слоя при последующем прорастании семени в условиях оптимального увлажнения. Чтобы сказать конкретно, какой этап этой системы зависит от условий года, надо провести дополнительные исследования. На последующих МФФ ПС влияние года нивелируется, о чем свидетельствует снижение коэффициента вариации.

Активность β-амилазы варьирует по МФФ ПС совершенно иначе. В сухом семени её активность практически не зависит от условий года выращивания семян ($K_{\text{вар}}=1,9$ в среднем по годам). Следовательно, в процессе созревания семени на материнском растении на синтез ферментного белка (β-амилаза) и на его количество условия выращивания влияют очень мало. Однако на развитие активности β-амилазы в прорастающем семени год репродукции семян оказывает существенное

влияние, о чем свидетельствуют возрастающие значения $K_{\text{вар}}$. Наибольшее влияние условий года проявляется за период от замачивания и до наклевывания семени: $K_{\text{вар}}$ активности β -амилазы возрастает в 5.3 раза.

Варьирование общей амилазной активности на первых МФФ ПС определяется β -амилазой, а затем – результирующими значениями работы двух ферментов.

Заключение. Впервые описана динамика изменения амилолитических ферментов в индивидуальном прорастающем семени ярового ячменя трёх сортов за три года по МФФ ПС. Выявлены общие для ярового ячменя и сортовые особенности изменения активности амилолитических ферментов при достижении семенем определенной МФФ ПС при проращивании их в условиях оптимального увлажнения.

Впервые показано, что активность α -амилазы регистрируется в прорастающем семени ярового ячменя только в МФФ ПС К1, когда происходит разрыв колеоризы корешком прорастающего семени. А активность β -амилазы присутствует в сухом семени и возрастает в процессе прорастания семени. Варьирование активности α -амилазы снижается в процессе прорастания семени, а варьирование активности β -амилазы, наоборот, возрастает.

Список литературы

1. Алехина Н.Д. Физиология растений / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др.; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр Академия», 2005. 450 с.
2. Гельманов М.А., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучение ферментов растений / М.А. Гельманов, О.В. Фурсов, А.П. Францев. – Алма-Ата. 1981. 92 с.
3. Игнатенко И.С. Применение экологически безопасного фактора синхронизации прорастания семян ярового ячменя в условиях пониженной температуры / Игнатенко И.С., Козяева С.Ю. // Труды II межд. Молодёжной конф. Улабуга, 23-24 декабря 2010г. Казань: Изд. Казан. Гостехн. Ун-та, 2010. – Том 1. С. 221-226.

4. Казакова А.С. Шкала микрофенологических фаз прорастания семян ярового ячменя / А.С. Казакова, С.Ю. Козяева // Сельскохозяйственная биология (серия Биология растений). – 2009. №3. С. 88-92.
5. Костин В.И. Физиологический механизм воздействия пектина и микроэлементов при прорастании семян зерновых культур / В.И. Костин, В.А. Исайчев, О.Г. Музурова // Вестник РАСХН. – 2006, №4 (июль-август), С 38-39.
6. Кретович В.Л. Основы биохимии растений /Кретович В.Л. – М.: «Высшая школа», 1971, С. 81,87.
7. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков, Л.А. Паничкин, М.Н. Кондратьев и др. – 4-е изд. перераб. и доп. М.: КолосС. 2003. – С.172-175.
8. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84; Введен 01.07.86. М.; ИПК Из-во стандартов. 2004. С. 34-38.
9. Якушкина Н.И. Физиология растений: учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности 032400 «Биология» / Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко. – М.: Гуманитар. Изд. центр ВЛАДОС, 2005. 321 с.
10. Livesley M.A. α -Amilase izoenzymes in aged wheat aleurone layers // Biochem. Soc/ Trans. 1991. V 19. №4/ P 360-364.