

С.К. Наекова, К.М. Аубакирова, З. Аликулов

*Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, Нур-Султан, Казахстан
(E-mail: n-saltan@mail.ru, aubakirova_km@enu.kz, zer-kaz@mail.ru)*

Влияние оптимального метода предпосевного прайминга семян в присутствии диатомита на рост и развитие проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и содержание в них пролина в условиях засоления

Аннотация: В результате проведенной работы были раскрыты закономерности воздействия диатомита на процессы роста, развития и накопления пролина в клетках стеблей и корней высших растений. Также было протестировано влияние данного минерала на стрессовые реакции высших растений, в частности, ряд ключевых абиотических стресс-факторов такой среды, как засоление. В ходе проведенной работы установлено, что солевой стресс увеличивает содержание свободного пролина. При обработке растений диатомитом содержание свободного пролина значительно увеличилось в сравнении с необработанными растениями. Следовательно, диатомит выполняет протекторную функцию в предотвращении негативных воздействий окружающей среды на высшие растения. Полученные результаты расширяют возможности использования диатомита в качестве природного удобрения для повышения устойчивости растения к биотическим и абиотическим стрессам.

Ключевые слова: ячмень, диатомит, засоление, пролин, предпосевный прайминг семян.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-129-4-35-41>

Введение. Стрессовые воздействия абиотической и биотической природы вызывают значительные потери урожая сельскохозяйственных растений [1-3]. Отмечающиеся в последние годы неадекватное природопользование и изменения окружающей среды способствуют усилению стрессовой нагрузки на растения, которые вызывают серьезные проблемы с производством сельскохозяйственных продуктов питания в засоленных и засушливых зонах [1, 2]. Это остро ставит задачу создания доступных и экологически-безопасных средств защиты растений от стресса.

Среди используемых в мире стресс-протекторов наибольшее применение находят химические агенты, действие которых направлено на контроль патогенов, т.е. на противодействие основным биотическим стрессорам [3]. В то же время защита от абиотических стресс-факторов, которые наносят не меньший ущерб, развита хуже. К абиотическим стрессорам относятся физико-химические воздействия неблагоприятных условий окружающей среды как природного, так и техногенного происхождения, в частности, засоление, засуха, переувлажнение и гипоксия, экстремальные температуры и значения кислотности почвы, высокие уровни тяжелых металлов, недостаток элементов минерального питания и многие другие [4,5].

На сегодняшний день все чаще говорят о применении в сельском хозяйстве новых, нетрадиционных методов повышения урожайности культурных растений. И в первую очередь речь ведут о диатомитах - осадочной горной породе, состоящей из раковин диатомовых водорослей. В последние годы минералы кремния, такие как диатомиты, рассматривают как источник растворимого кремнезема, который играет важную роль в формировании плодородия почв, повышении продуктивности растений и их устойчивости к болезням. Повышение устойчивости растений к засолению и засухе с использованием природных удобрений представляет большой интерес. Во многих странах в этих целях уже широко используют диатомит [6,7].

Прорастание семян и появление проростков являются критической стадией в жизненном цикле растений. Хорошее развитие проростков повышает конкурентоспособность растений против сорняков, устойчивость в сухой период, урожайность. Общеизвестный факт - предпосевной прайминг семян улучшает прорастание, сокращает время появления проростков и улучшает их становление. По методу прайминга семян проведено много работ, и

результаты этих исследований показывают его важность при выращивании многих видов сельскохозяйственных культур [8].

Важное значение для жизнедеятельности растений в условиях засоления имеет изменение водно-осмотического режима, особенно, степень осморегуляции растений. Увеличение осмотического потенциала клеточного сока сопровождается повышением концентрации в клетке осмолитов, таких как пролин, полиамин, органические кислоты и другие низкомолекулярные соединения. Первостепенную роль в росте устойчивости растений к последовательному воздействию факторов стресса играет повышенное содержание пролина. Было установлено, что пролин играет важную роль в устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды. Также их экзогенное добавление в объект эффективно действует на устойчивость растения. Например, некоторые растения рода *Melaleuca*, эндемики Австралии, отличаются способностью выдерживать стрессы окружающей среды. Их устойчивость к стрессам связана с аккумуляцией большого количества производных пролина. К ним относятся N-метилпролин, транс-4-гидрокси-N-метилпролин и транс-4-гидрокси-N-диметилпролин. Эти осмопротекторы можно легко экстрагировать из растений, обрабатывать ими семена и опрыскивать листья для повышения устойчивости растения к биотическим стрессам [9]. Поэтому изучение возможной роли диатомита в индукции повышения концентрации пролина в условиях засоления являются целью данной работы.

Методы исследования. Объект исследования - ячмень обыкновенный – *Hordeum vulgare* L., представитель семейства злаков (*Poaceae*). Семена ячменя стерилизовали в 0, 5% растворе перманганата калия (10 минут) и в течение недели выращивали в двух средах (в чистой дистиллированной воде на фильтрованной бумаге в чашках Петри, также высевали в пластиковые емкости объемом 150 мл, содержащие почвогрунт). В каждый горшочек и чашки Петри высаживали по 10 зерен ячменя и поливали обычной дистиллированной водой в одинаковом количестве. Во избежание контакта с воздухом в водной среде семена должны быть на дне воды.

Было установлено что суспензии диатомита в концентрациях 10 - 20 г/100 мл являются оптимальными в двух средах при прайминге семян. Для изучения механизма влияния кремния в составе диатомита на устойчивость растений использовали 0,1мМ раствор Na_2SiO_3 , который соответствует содержанию кремния в 15г ДТМ. Через неделю испытывали устойчивость растения к засолению. Моделирование солевых условий проводилось с раствором 75 мМ NaCl (среднее засоление).

Эксперимент проводился в лабораторных условиях при средней дневной / ночной температуре 20/18 °С, относительной влажности воздуха от 50 до 55% и освещенности окружающей среды. Образцы были собраны через 7 дней. Для измерения критериев роста было отобрано 70 проб растений, а для определения свободного пролина были взяты 30 других проб. Были описаны морфологические признаки (измеряли длину корня и стеблей каждого растения) и получены снимки.

Определение содержания свободного пролина в образцах корней растений проводили по классическому методу Bates (1973) [10]. Навеску растительного материала (0.5– 1.0 г сырых листьев) гомогенизировали в 2 мл сульфосалициловой кислоты. Затем центрифугировали в течение 20 мин (15000g). Для определения пролина к супернатанту 2мл добавляли 2мл ациднингидринового реактива и 2мл ледяной уксусной кислоты. Смесь реагентов нагревали на водяной бане при 100 °С в течение 1 часа. Реакцию останавливали, погружая пробирки в холодную воду. Затем реакционную смесь экстрагировали изопропиловым спиртом и определяли оптическую плотность в спектрофотометре "Specol-1300" (Германия) при длине волны 520нм. Статистическую обработку групп данных проводили в приложении Anova. Значимость различий оценивали по p-value ($p \leq 0.05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено положительное влияние предпосевного прайминга семян ячменя в суспензиях диатомита в различных концентрациях на рост и развитие во время солевого стресса: проявляется в длине корня и стебля проростков (рис. 1).

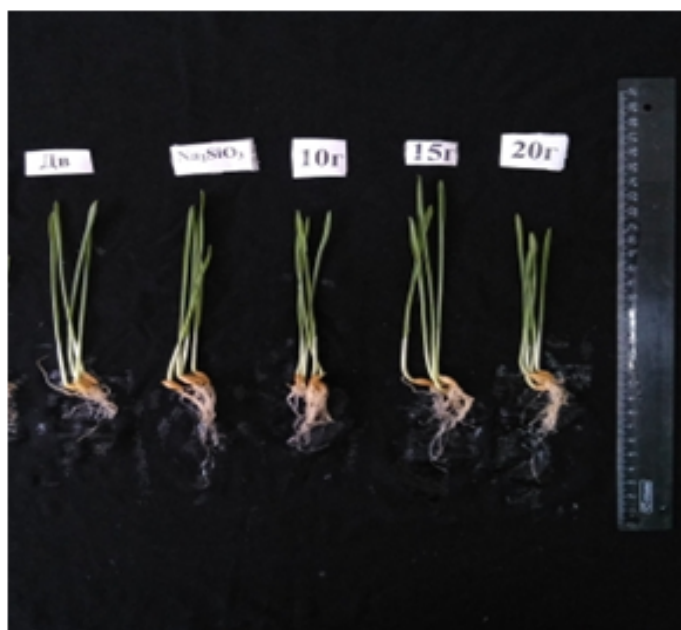


Рисунок 1 – 7-дневные проростки ячменя в дистиллированной водной среде с NaCl (75мМ) после предпосевного прайминга семян. Дв – прайминг с дист.водой; Na₂SiO₃ - прайминг с 0,1мМ раствором (соответствует 15г ДТМ); 10,15, 20 - грамм ДТМ в 100 мл Н₂О

В контрольном варианте, в присутствии NaCl (т.е. солевого стресса) в фильтрованной бумаге и в почвенной среде, развитие проростков ячменя угнетается. Средняя длина стебля и корня в воде не превышает 8 см и 4,34, соответственно, в то же время в почве эти параметры соответствовали 20,3 см и 7,74 см. Также растения при солевом стрессе сильно ослаблены, листья скрученные (Рис. 1,2).

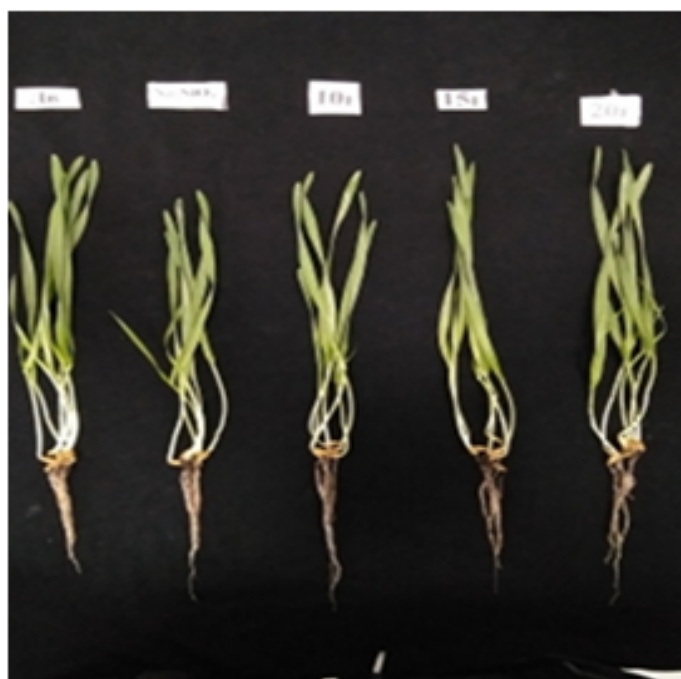


Рисунок 2 – 7-дневные проростки ячменя в почвенной среде с NaCl (75мМ) после предпосевного прайминга семян. Дв – прайминг с дист.водой; Na₂SiO₃ - прайминг с 0,1мМ раствором (соответствует 15г ДТМ); 10,15, 20 - грамм ДТМ в 100 мл Н₂О

Однако в случае прайминга семян в суспензии ДТМ ингибирование роста и развития проростков снижается. В трех таких вариантах длина корней проростков оказалась выше на 0,8

– 1.0 см по сравнению с контролем, но отмечается одинаковая длина стеблей. Диаметр стебля после прайминга семян с данной суспензией также был больше по сравнению с контролем на 0,05 мм.

Таблица 1 - Влияние на рост и развитие проростков ячменя предпосевого прайминга семян Na_2SiO_3 и

	ДТМ во время заселения				
	H ₂ O(контроль)	Na ₂ SiO ₃	ДТМ 10	ДТМ 15	ДТМ 20
Средняя длина стебля	10,7±0,44	10,9±0,45	10,8±0,41	10,5±0,05	10,7±0,68
Средняя длина корня	4,6±0,32	4,8±0,20	5,1±0,05	5,4±0,35	5,2±0,4
Процент прорастания	86,7±0,42	91,1±0,30	86,7±0,08	82,2±0,08	86,7±0,7

Прайминг семян с силикатом натрия (0,1 ммоль) также благоприятно повлиял на рост и развитие во время стрессовых условий, средняя длина корня составляет 4,8 см, а стебля - 10,7 см (табл.1).

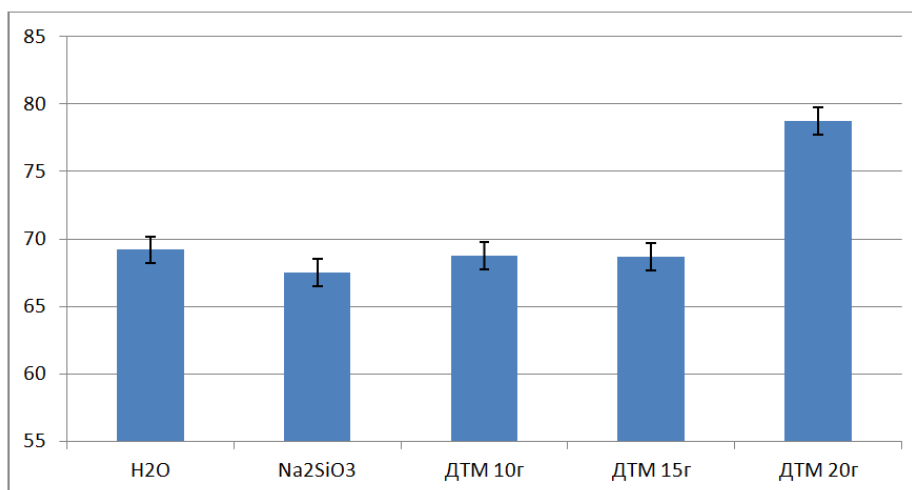


Рисунок 3 – Влияние прайминга диатомитом на процент прорастания семян ячменя

Наши результаты показали, что замачивания в течение 24 часов (первая стадия прайминга) было достаточно для полного насыщения семян водой при различных температурах. Замачивание до полного обводнения семян при низкой температуре (5 °С) и последующее их высушивание при комнатной температуре приводило к максимальному проценту прорастания семян этих злаков по сравнению с контролем (рис. 3).

Таблица 2- Содержание пролина (мкг/г) в корнях и стеблях 5-дневных проростков, выращенных из семян после предпосековой обработки в средnezасоленной жидкой среде (75 мМ NaCl)

№	Корень	Стебель
H ₂ O(контроль)	0,04±0,03	0,026±0,06
Na ₂ SiO ₃	0,045±0,05	0,035±0,04
ДТМ – 10 г/100 мл H ₂ O	0,042±0,04	0,037±0,02
ДТМ – 15 г/100 мл H ₂ O	0,046±0,08	0,055±0,09
ДТМ – 20 г/100 мл H ₂ O	0,06±0,07	0,04±0,06

Влияние предпосевого прайминга семян в различных суспензиях диатомита на содержание пролина в проростках, выращенных в присутствии NaCl (табл.2). Среднее засоление (75 мМ NaCl) почвы сильно подавляет всхожесть и прорастание сухих семян ячменя, а также

рост и развитие их проростков. Предпосевной прайминг семян в дистиллированной воде не предотвратил ингибирующее действие почвенной соли.

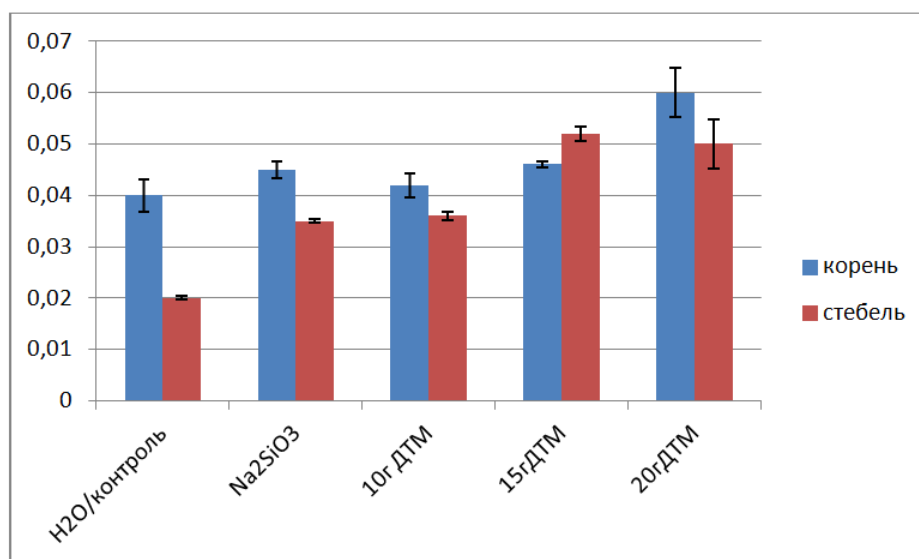


Рисунок 4 – Сравнительное количество пролина в стеблях и в корнях (мкг/г) у образцов проростков, выращенных в жидкой среде с 75 мМ NaCl

Установлено, что предварительная термообработка (2 часа при 120⁰ С) образцов диатомита повышает его эффект на прорастание и устойчивость проростков к стрессам. В присутствии диатомита в концентрации 10 мг/кг почвы всхожесть семян ячменя после предпосевого прайминга и темп роста их проростков резко возрастали (рис.4).

В защитных системах растений главную роль играет пролин, который участвует в повышении осмотического давления клеточных растворов и защищает белковолипидные комплексы путем обезвреживания активных форм кислорода, разрушающих биомембраны. Природное и техногенное засоление приводит к оцелачиванию. Растения, произрастающие на засоленных и засушливых территориях, характеризовались повышенным количеством пролина в листьях и подземных органах [11]. В модельных опытах у растений с разным конститутивным уровнем пролина (*Hordeum vulgare*) стресс-индуцированная реакция на засоление корневой среды сопровождалась аккумуляцией этого осмопротектора [12]. По-видимому, пролин аккумулируется в большом количестве во время окислительного стресса. В экспериментах уровень NaCl-зависимой аккумуляции пролина у растений был выше, чем у обработанных с диатомитом семян ячменя. Вместе с тем, прайминг с диатомитом семян на фоне засоления и засухи резко снижает степень перекисного окисления мембран при солевом стрессе.

Как видно из диаграмм, прайминг семян ячменя с различными концентрациями диатомита несколько улучшает рост проростков в соленой среде и засухе, а также образуется большое, чем в контрольных растениях, количество пролина, так как прайминг семян с различными концентрациями диатомита имеет стресс-протекторное свойство для растений. Таким образом, можно отметить, что предпосевный прайминг семян ячменя в оптимальной концентрации диатомита дает быстрый рост и имеет некоторые морфофизиологические преимущества перед контролем.

Заключение. Солевой стресс увеличивает содержание свободного пролина. При обработке растений диатомитом содержание свободного пролина значительно увеличилось по сравнению с необработанными растениями. Следовательно, диатомит выполняет протекторную функцию в предотвращении негативных воздействий окружающей среды на высшие растения.

Таким образом, первостепенная роль в повышении устойчивости растений к последовательному воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды отводится пролину. Пролин рассматривается как стабилизатор мембран и некоторых макромолекул,

а также свободных радикалов. Как было сказано выше, различные производные пролина являются потенциальными осмопротекторами в условиях засоления среды [9]. В связи с этим интересно отметить, что в клеточных стенках восьми морских видов диатомовых водорослей найдены 3,4-дигидроксипролин и другие производные пролина [13]. По-видимому, в диатомитах растворимая форма кремния - кремнезем (основной компонент диатомита) - является индуктором синтеза пролина или его производных в условиях высокой концентрации соли. Поэтому в будущих исследованиях необходимо изучение форм пролина, синтез которых происходит в присутствии диатомита.

Результаты по изучению физиолого-биохимических механизмов действия аморфного диатомита будут значительным вкладом в физиологию растений в области влияния природных пород на растения. Полученные результаты расширят возможности использования диатомита в качестве природного удобрения для повышения устойчивости растения к биотическим и абиотическим стрессам.

Список литературы

- 1 Shabala S. Plant physiology. Plants – Effect of stress on adaptation. – 2nd ed. – Boston, MA: CABI, 2017. – 376 p.
- 2 Sengar R.S. Climate change effect on crop productivity. – CRC Press, 2014. – 538 p.
- 3 Gross M. New directions in crop protection // Current Biology. – 2011. – Vol. 21, № 17. – P. 641–643.
- 4 Savvides A. Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible? // Trends in Plant Science. – 2016. – Vol. 21, № 4. – P. 329–340.
- 5 Wang M. Role of silicon on plant–pathogen interactions // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8. – P. 701–715.
- 6 Gymez J. Diatomite releases silica during spirit filtration // Food Chem. – 2014. – Vol. 15, № 159. – P. 381–387.
- 7 Козлов А.В. Влияние диатомита на биопродуктивность зерновых культур и численность микробного сообщества почвы // Агрехимический вестник. – 2012. – Т. 5. – С. 39–41.
- 8 Tiburcio A.F. Abiotic stress tolerance // Plant Science. – 2012. – Vol. 182. – P. 1–2.
- 9 Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annual Review in Plant Biology. – 2002. – Vol. 59. – P. 651–681.
- 10 Bates L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. -1973. -Vol. 39. -P. 205-207.
- 11 Jain M.G., Mathur S., Koul and N.B. Sarin/Ameliorative effects of proline on salt stressinducted lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.)// Pl. Cell Rep. – 2001. – Vol. 20. – P. 463–468.
- 12 Liang Y.C., Ding R.X. Influence of silicon on microdistribution of mineral ions in roots of salt-stressed barley as associated with salt tolerance in plants//Sci China (Series C). – 2002. – Vol. 45. – P. 298–308.
- 13 Nakajima T, Volcani B.E. - 3, 4-Dihydroxyproline: a new amino acid in diatom cell walls//Science.- 1969.- Vol. 12.-P. 25-32.

С.К. Наекова, Қ.М.Әубәкірова, З.Әліқұлов

Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Арпа (*Hordeum vulgare* L.) өскіндерінің өсуі, дамуы және тұздану жағдайында құрамындағы пролин мөлшеріне диатомиттің қатысуымен тұқым праймингінің оңтайлы әдісінің әсері

Аңдатпа. Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде диатомиттің жоғары өсімдіктердің өсуі, дамуы және сабақтары мен тамырларының жасушаларында пролиннің жиналуы процестеріне әсер ету заңдылықтары ашылды. Сондай-ақ, бұл минералдың жоғары өсімдіктердің стрестік реакцияларына, органың бірқатар маңызды абиотикалық стресс-факторларына атап айтқанда, сортаңдау кезінде әдісімен сыналды. Жүргізілген жұмыс барысында тұзды стресс еркін пролин мөлшерін арттыратыны анықталды. Өсімдіктерді диатомитпен өңдеу кезінде өңделмеген өсімдіктерге қарағанда бос бпролиннің құрамы айтарлықтай артты. Демек, диатомит қоршаған органың жоғары өсімдіктеріне теріс әсерін болдырмауда протекторлық функцияны орындайды. Алынған нәтижелер өсімдіктің биотикалық және абиотикалық стрессерге төзімділігін арттыру үшін табиғи тыңайтқыш ретінде диатомитті пайдалану мүмкіндігін кеңейтеді.

Түйін сөздер: арпа, диатомит, тұздану, пролин, тұқым праймингі.

S.K.Nayekova, K.M.Aubakirova, Z.Alikulov

L.N.Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Influence of the optimal method of pre-seed priming of seeds in the presence of diatomite on the growth and development of barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) and their proline content in salinization conditions

Abstract. As a result of the work, the regularities of the impact of diatomite were revealed on the processes of growth, development and accumulation of Proline in the cells of stems and roots of higher plants. The influence of this mineral on the stress reactions of higher plants were also tested a number of key abiotic environmental stress factors such as salinization,. In the course of the work it was found that salt stress increases the content of free Proline. When treating plants with diatomite, the content of free Proline increased significantly than on untreated plants. Therefore, diatomite performs a protective function

in preventing negative environmental effects on higher plants. The obtained results expand the possibilities of using diatomite as a natural fertilizer to increase the plant's resistance to biotic and abiotic stresses.

Keywords: barley, diatomite, salinization, Proline, pre-sowing seed priming

References

- 1 Shabala S. Plant physiology. Plants – Effect of stress on adaptation. – 2nd ed. (Boston, MA: CABI, 2017).
- 2 Sengar R.S. Climate change effect on crop productivity. (Boca Raton: CRC Press, 2014).
- 3 Gross M. New directions in crop protection, *Current Biology*, 21(17), 641–643 (2011).
- 4 Savvides A. Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?, *Trends in Plant Science*, 21(4), 329–340 (2016).
- 5 Wang M. Role of silicon on plant–pathogen interactions, *Frontiers in Plant Science*, 8,701–715 (2017).
- 6 Gymez J. Diatomite releases silica during spirit filtration, *Food Chem*, 15 (159), 381–387 (2014).
- 7 Kozlov A.V. Vliyanie diatomita na bioproduktivnost zernovyih kultur i chislennost mikrobnogo soobshchestva pochvyi [Influence of diatomite on the bioproduktivnost of grain crops and the number of soil microbial community], *Agrohimicheskiy vestnik [Agrochemical Bulletin]*, 5, 39–41 (2012). [in Russian].
- 8 Tiburcio A.F. Abiotic stress tolerance, *Plant Science*, 182, 1–2 (2012).
- 9 Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review in Plant Biology*, 59, 651–681 (2002).
- 10 Bates L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant Soil*, 39, 205–207, (1973).
- 11 Jain M.G., Mathur S., Koul and N.B. Sarin/Ameliorative effects of proline on salt stressinducted lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.), *Pl. Cell Rep.*, 20, 463–468 (2001).
- 12 Liang Y.C., Ding R.X. Influence of silicon on microdistribution of mineral ions in roots of salt-stressed barley as associated with salt tolerance in plants, *Sci China (Series C)*, 45, 298–308 (2002).
- 13 Nakajima T, Volcani B.E. - 3, 4-Dihydroxyproline: a new amino acid in diatom cell walls, *Science*, 12, 25–32 (1969).

Сведения об авторах

Наекова С.К. - докторант специальности "6D060700 - Биология", Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Аубакирова К.М. - кандидат биологических наук, и.о. доцента кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Аликулов З.А. - кандидат биологических наук, и.о. профессора кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Нур-Султан, Казахстан.

Naekova S. K. - doctoral student of specialty 6D060700 – Biology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Aubakirova K. M. - candidate of biology sciences, Assistant professor of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Alikulov Z. A. - candidate of biology sciences, professor of the Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 23.09.2020