

УДК: 575.633

Н. Ж. ОМИРБЕКОВА

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы)

Изучено влияние 1% водного раствора различных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на содержание свободного пролина, содержание белка, активность ряда ферментов азотного и энергетического метаболизма и количественные показатели анатомической структуры пшеницы. Показано достоверное накопление свободного пролина в корнях растений пшеницы сорта Шагала под действием ПАВ. Установлено, что у ряда мутантных линий содержание белка в семенах повышается от 5 до 9%, по сравнению с исходными сортами Шагала и Женис. Полученные с помощью ПАВ мутанты имели достоверную более высокую, либо менее низкую активность изучаемых ферментов по сравнению с исходными сортами. Селекционную ценность по признаку «опушение листа» представляют мутантные линии 1, 7, 23 и 24.

Казахстан является одной из крупнейших зернопроизводящих стран мира. Площадь посева основной продовольственной культуры – пшеницы составляет более 14 млн. га. Одним из главных факторов увеличения валового сбора зерна является селекционный путь – создание высокоурожайных сортов с комплексом ценных хозяйствственно-значимых признаков и свойств. Успех в решении задачи зависит от уровня генетического разнообразия исходных коллекций, гибридных популяций, методологии отбора желаемых генотипов в ходе селекционного процесса.

Направленная мутационная изменчивость может быть индуцирована химическими соединениями, которые участвуют в метаболизме растений и обладают регуляторным действием [1]. Для этого необходимо подобрать в качестве мутагена химические соединения, вызывающие изменчивость с положительным эффектом. Одним из возможных таких соединений являются поверхностно-активные вещества.

В литературе встречаются работы о различных биоэффектах и нарушениях структуры и функции организмов при воздействии синтетических ПАВ [2, 3]. Так, воздействие различных концентраций водного раствора додецилсульфата натрия на жизнеспособность водного макрофита (*Potamogeton crispus L.*) показало, что ПАВ изменяет морфологические признаки растения в зависимости от экспозиции [3]. Изучение зависимости роста пшеницы под влиянием анионного детергента и неионогенного ПАВ показало одновременно положительное и вредное действие

в зависимости от концентрации и времени обработки. Причина стимуляции роста до сих пор неясна. Однако авторы показали, что ПАВ могут оказывать различное действие на организм: взаимодействовать со структурными белками и ферментами, с цитомембранными, повышать абсорбцию ауксина, солюбилизировать хлорофилл-белковый комплекс, подавлять синтез белков и ДНК [4]. Изучение генетических и биохимических особенностей индуцированных мутантов дает возможность познать не только механизмы мутационной изменчивости, но и решить вопросы, связанные с рациональным использованием индуцированных мутантов в селекции растений [1].

При предпосевной обработке семян мягкой пшеницы водными растворами ПАВ ранее получены растения с измененными количественными и качественными признаками, которые стойко наследовались в поколениях  $M_1$ - $M_3$ . По сорту пшеницы Женис и Шагала в  $M_1$  получены растения, которые характеризуются разными морфологическими признаками: форма колоса, зерна, длина стебля, продуктивной кустистостью, увеличением числа зерен и массы с главного колоса, безостые или остистые, антоциановой окраской и др.

Целью исследования явилось изучение влияния ПАВ на содержание свободного пролина в проростках пшеницы, активность ряда ферментов азотного и энергетического обмена мутантных линий и анатомическую структуру для получения достоверной информации о ценности полученных генотипов.

**Материалы и методы исследования.**

Объектом исследования служили 14-дневные проростки, полученные после обработки ПАВ. Контролем служили семена мягкой пшеницы сортов Женис и Шагала.

Для получения 14-дневных проростков, семена замачивали в 1% водном растворе ПАВ в течение 5 часов, при температуре 25°C. Обработанные семена промывали 30 мин в проточной воде, затем по 5 мин. трижды – стерильной водой. Семена проращивали 48 часов в чашках Петри на смоченной водой фильтровальной бумаге в термостате при t 25°C и затем при комнатной t на свету. Контролем служили необработанные семена пшеницы.

Семена пшеницы перед посевом обрабатывали 1% водным растворами ПАВ, применяемых в биологических исследованиях: тритон X-305, тритон X-100; твин 85, твин 65, твин 20. Экспозиция 5 часов при t 25°C. После обработки ПАВ семена промывали 30 мин проточной водой, подсушивали и проводили посев на полях КазНИИ земледелия и растениеводства. Контролем служили сухие семена исходного сорта.

Определение содержания свободного пролина в вегетативных органах проростков проводили по методу L. Bates с соавт. [5]. Для определения содержания пролина был построен калибровочный график в интервале от 0,01 до 0,2 mM пролина “Ajinomoto” (Япония). Содержание общего белка определяли микробиуретовым методом по Бейли при длине волны 330 нм [6]. Активность ферментов определяли общепринятыми методами [7]. Измерение активности ферментов проводили по изменению абсорбции при 340 нм на спектрофотометре Ultrospec 1100 pro Biosciences Amersham (Великобритания). Реакционные смеси для определения активности малатдегидрогеназы (МДГ) содержали NAD и малат; для алкогольдегидрогеназы (АДГ) – NAD и 96% этанол; для глютаматдегидрогеназы (ГДГ) – NADH, 2-оксоглютарат, сульфат аммония; для ферментного комплекса малатдегидрогеназы и глютаматоксалоацетатаминотрансферазы (ФК МДГ-ГОАТ) – малат, NAD, глютамат.

Для анатомических исследований вегетативные органы растений фиксировали по общепринятым методикам [8]. Микрофотографирование объектов исследования проводили на микроскопах Axioskop 40, (Carl Zeiss) и цифровой фотока-

меры Canon Power Shot S45. Статистическая обработка проведена согласно П. Ф. Рокицкому [9].

**Результаты и их обсуждение.** Одним из адаптивных свойств растений к стресс-факторам является аккумуляция пролина в клетках. Накопление пролина может происходить вследствие активации синтеза этой аминокислоты, ингибирования процессов его распада или усиления гидролиза белков, содержащих большие количества пролина [10]. Скорость адаптационных механизмов к стрессовым факторам определяется способностью растений быстро индуцировать системы аккумуляции пролина в ответ на действие стресса [11].

Учитывая важную роль пролина в адаптации к абиотическим факторам, было изучено его содержание у проростков пшеницы, обработанных 1% водным раствором тритон X-100 (табл. 1).

Таблица 1. Действие 1% ПАВ тритон X-100 на накопление свободного пролина в вегетативных органах проростков пшеницы сорта Шагала

Варианты опыта	Накопление свободного пролина в вегетативных органах пшеницы, мг/г		
	листья	стебли	корни
Контроль	0,50±0,01	0,40 ± 0,02	0,60±0,03
Тритон X-100	0,40±0,02**	0,35 ± 0,01*	1,95±0,11***

Примечание. При \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Содержание свободного пролина в листьях и стеблях проростков пшеницы, по сравнению с контролем незначительно снижается. Показано достоверное накопление свободного пролина в корнях растений пшеницы сорта Шагала под действием ПАВ. Так, накопление пролина в корнях (1,95 мг/г) увеличивается более, чем в 3 раза относительно контроля (0,60 мг/г). Высокое накопление свободного пролина в корнях растений пшеницы свидетельствует о защитной реакции пшеницы на действие ПАВ тритон X-100. Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что высокое содержание свободного пролина в проростках растений является показателем устойчивости организма к действию абиотических факторов [10].

Проведено сравнительное изучение количественного содержания растворимого белка в семенах мутантных форм и исходных сортов пшеницы сорта Шагала и Женис. Установлено, что у

Таблица 2. Активность ферментов азотного и энергетического обмена у мутантных линий и исходных сортов пшеницы Шагала и Женис

Сорт и мутантные линии	Содержание белка, мг/мл	Удельная активность ферментов, мкМ/мг			
		МДГ	ФК МДГ-ГОАТ	АДГ	ГДГ
Шагала	0,188	32,26±0,01	444,44±0,01	516,12±0,01	72,58±0,01
Линия 1	0,182	33,87±0,02***	353,04±0,01***	519,35±0,02***	74,19±0,01***
Линия 2	0,172	33,87±0,01***	362,42±0,01***	396,77±0,01***	64,51±0,01***
Линия 3	0,198	67,44±0,03***	303,22±0,01***	511,29±0,03***	64,51±0,01***
Линия 4	0,205	46,77±0,02***	224,27±0,01***	408,06±0,02***	46,77±0,01***
Линия 5	0,200	38,70±0,03***	349,14±0,02***	424,19±0,02***	62,90±0,01***
Линия 6	0,163	58,06±0,03***	360,53±0,01***	462,9±0,03***	67,74±0,01***
Линия 7	0,143	43,54±0,03***	433,17±0,01***	446,77±0,01***	62,90±0,01***
Линия 8	0,148	35,48±0,01***	443,0±0,01***	433,87±0,01***	70,96±0,01***
Линия 9	0,165	45,16±0,04***	349,14±0,02***	438,7±0,03***	58,06±0,01***
Линия 10	0,172	51,61±0,01***	344,82±0,02***	424,19±0,01***	53,22±0,01***
Линия 11	0,137	50,0±0,01***	359,44±0,01***	408,06±0,03***	53,22±0,01***
Женис	0,192	38,70±0,02	353,13±0,01	511,29±0,01	83,87±0,01
Линия 23	0,210	29,03±0,01***	350,23±0,01***	346,77±0,01***	80,64±0,01***
Линия 24	0,190	77,41±0,02***	247,87±0,01***	370,96±0,01***	4,83±0,01***

Примечание. При \*\*\* P < 0,001.

мутантной линии 3 (плотный короткий колос), линии 4 (крупное зерно и отсутствие остьей), а также линии 5 (удлиненный колос) содержание белка повышается от 5 до 9% по сравнению с исходным сортом Шагала. У мутантной линии 23 (удлиненное зерно, остистая форма) содержание растворимого белка в семенах на 9% (0,210 мг/мл) выше, чем у исходного сорта Женис – 0,192 мг/мл (табл. 2).

Следует отметить, что увеличение содержания белка характерно не для всех мутантных линий и зависит от исходного генотипа. Например, при действии ПАВ твин 20 в концентрации 1% на сорт Шагала (булавовидный колос), содержание растворимого белка уменьшается на 28% по сравнению с контролем (0,137 мг/мл и 0,188 мг/мл, соответственно).

Изменение активности ферментов метabolизма является одним из достоверных критериев изменения генетического аппарата под воздействием мутагенов. Поэтому представляло особый интерес изучение активности ряда ключевых ферментов азотного и энергетического обмена у мутантных генотипов в сравнении с исходными сортами. Изучение активности ферментов дает возможность судить об интенсивности метabolизма растительного организма и более достоверно оценить жизнеспособность полученных мутантных генотипов.

Установлено снижение активности фермента ГДГ, активности ферментов АДГ и фермент-

ного комплекса МДГ-ГОАТ у всех мутантных форм, за исключением мутантной линии 1. Снижение активности фермента ГДГ является благоприятным антистрессовым фактором, поскольку этот фермент в результате реакции выделяет токсический аммиак разрушающий биомембранны. Общее снижение активности фермента АДГ говорит о подавлении анаэробного дыхания. Наоборот, при изучении активности фермента энергетического метаболизма МДГ у всех мутантных линий сорта Шагала показано его повышение от 4 до 109%. Поскольку фермент МДГ участвует в процессе дыхания, увеличение активности свидетельствует об улучшении энергетических процессов.

Изучение активности ключевых ферментов азотного и энергетического метаболизма показало, что полученные с помощью ПАВ мутанты имели достоверную более высокую либо менее низкую активность изучаемых ферментов по сравнению с исходными сортами. Это свидетельствует о генетически закрепленных биохимических признаках данных мутантных генотипов. Эти закрепленные признаки можно использовать в качестве ферментных маркеров при вовлечении мутантных линий в практическую селекцию.

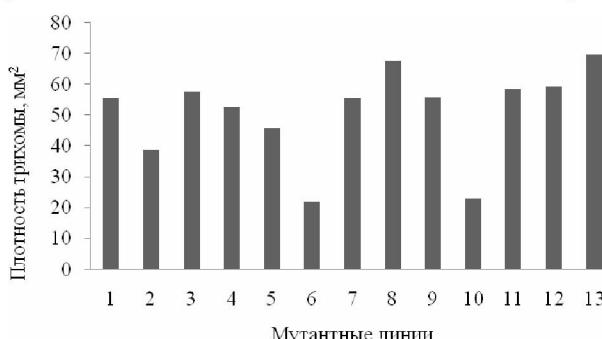
Таким образом, изученные мутантные генотипы пшеницы, индуцированные ПАВ в концентрации 1%, имеют не только специфические морфологические признаки, но и отличаются от исходных сортов по своим биохимическим показателям,

таким как содержание растворимого белка и активности ключевых ферментов азотного и энергетического обмена. Это говорит о большой перспективе применения изученных ПАВ в концентрации 1%, как слабых мутагенов при создании исходных генотипов пшеницы.

При обработке семян мягкой пшеницы сорта Женис и Шагала ПАВ были получены мутантные линии с признаком «опущенность», поэтому представляло интерес изучить плотность и размер трихомы листовых пластинок. Трихома пшеницы представляет собой одноклеточное или многоклеточное образование эпидермиса и относится к простым кроющим волоскам [12]. Опушение листа у пшеницы имеет большое биологическое значение при адаптации к факторам среды. Изучение особенностей морфологии опушения, а также выявление генетических факторов, ответственных за его формирование, позволяет получить сорта, обладающие устойчивостью к суровым климатическим условиям, а также невосприимчивостью к ряду вредителей [13].

Объектом изучения явились предфлаговые листья мутантных линий с признаком «опущенность» и исходные сорта. Сорт Шагала не является носителем признака «опущенность листа», а Женис – является. Измерение длины клеток трихом и определение их плотности (число трихом на единицу площади) проводили на верхней и нижней листовой пластинке.

Сравнительная оценка признака «опущенность» у мутантных линий и исходных сортов представлена на рис. 1. Результаты исследований показали, что мутантные растения, индуцированные ПАВ, отличаются от исходного сорта



**Рис. 1.** Общее распределение трихом по плотности в листьях мутантных линий пшеницы сорта Шагала (1-11) и сорта Женис (12-13): 1 – линия 1, 2 – линия 2, 3 – линия 3, 4 – линия 4, 5 – линия 5, 6 – линия 6, 7 – линия 7, 8 – линия 8, 9 – линия 9, 10 – линия 10, 11 – линия 11; 12 – линия 23, 13 – линия 24

наличием трихом и их числом на единицу площади. Высокая плотность трихом выявлена на нижней поверхности листовой пластинки по сравнению с их количеством на верхней листовой пластинке до 3 раз. По плотности числа трихом на единицу площади, условно выделены растения с высокой плотностью  $55,5 - 69,8 \text{ мм}^2$ , средней – от 45,8 до  $52,8 \text{ мм}^2$  и низкой – от 22,1 до  $38,8 \text{ мм}^2$ .

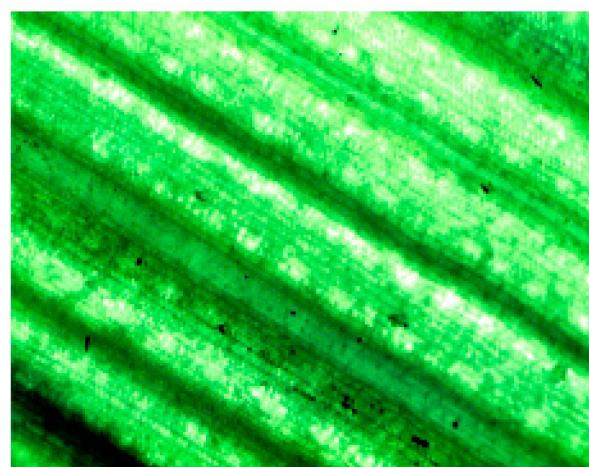
К растениям, обладающим высокой плотностью трихом на нижней стороне листовой пластинки относятся: линия 1, линия 3, линия 8 сорта Шагала и линия 24 сорта Женис, индуцированные тритоном X-305, тритоном X-100, твином 65.

Длина трихомы является маркерным признаком, по которым можно проводить отбор растений, устойчивых к суровым климатическим условиям среды и биотическим факторам. В связи с этим определили длину трихом у мутантных линий пшеницы (табл. 3).

**Таблица 3. Длина трихомы листовой пластинки исходных сортов Шагала, Женис и мутантных форм, индуцированные ПАВ**

Линии	Длина трихом, мм
Сорт Шагала	
Контроль	–
Линия 1	<b><math>0,324 \pm 0,05</math></b>
Линия 2	$0,181 \pm 0,03$
Линия 3	$0,143 \pm 0,02$
Линия 4	$0,218 \pm 0,05$
Линия 5	$0,202 \pm 0,04$
Линия 6	$0,231 \pm 0,05$
Линия 7	<b><math>0,260 \pm 0,04</math></b>
Линия 8	$0,165 \pm 0,05$
Линия 9	$0,152 \pm 0,02$
Линия 10	$0,163 \pm 0,02$
Линия 11	$0,171 \pm 0,04$
Сорт Женис	
Контроль	$0,228 \pm 0,03$
Линия 23	$0,266 \pm 0,04$
Линия 24	$0,269 \pm 0,03$

По длине трихом мутантные линии пшеницы условно были разделены на: линии с длинной (от 0,202 до 0,324 мм) и короткой трихомой (от 0,143 до 0,181 мм). Селекционную ценность представляют мутантные линии 1, 7, 23 и 24 у которых длина трихом варьирует в пределах  $0,260 \pm 0,04 - 0,324 \pm 0,05$  мм (рис. 2).



Шагала контроль (опушения нет)

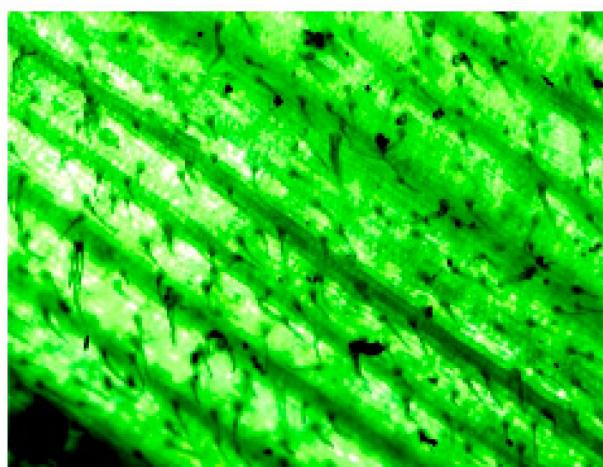
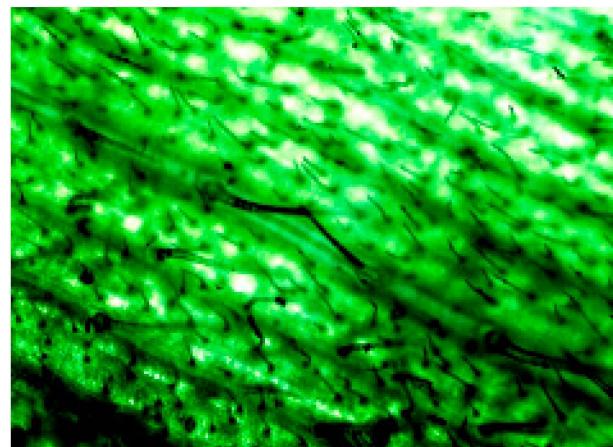
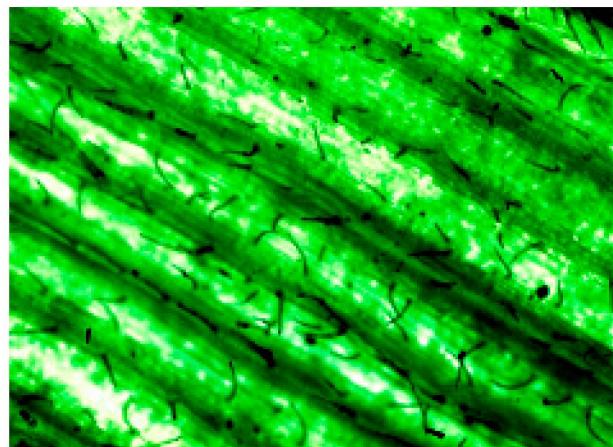
Линия 1 (длина трихомы  $0,324 \pm 0,05$  мм)Линия 11 (длина трихомы  $0,171 \pm 0,04$  мм)Линия 7 (длина трихомы  $0,260 \pm 0,04$  мм)

Рис. 2. Общее распределение трихом по плотности в листьях мутантных линий пшеницы сорта Шагала

Таким образом, нами впервые, с помощью ПАВ, удалось впервые получить 11 константных мутантных генотипов мягкой пшеницы по сорту Шагала и 2 линии по сорту Женис, которые имеют более ценные хозяйствственные признаки по сравнению с исходными сортами. Изучение полученных мутантных генотипов показало, что они имеют не только специфические морфологические признаки, но и существенно отличаются от исходных сортов по своим биохимическим показателям, таким как, содержание растворимого белка, активность ключевых ферментов энергетического метаболизма и обмена глютамата – центральной аминокислоты азотного обмена. Все это говорит о большой перспективе применения слабых мутагенов – поверхностно-активных веществ при получении ценных генотипов мягкой пшеницы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Поползухина Н.А. Индуцированный мутагенез и гибридизация в селекции яровой мягкой пшеницы. Омск, 2003. 224 с.
- Остроумов С.А. Биологические эффекты при воздействии поверхностно активных веществ на водные организмы. М.: Макс. Пресс, 2001. 334 с.
- Остроумов С.А., Колотская КН., Трескунов Н.А., Карташова КВ., Лякили М.Я., Краевский В.М. Воздействие КПАВ из класса четвертичных аммониевых соединений на одноклеточные цианобактерии, зеленые водоросли и коловратки // Водные экосистемы и организмы. М.: МГУ, 2000. С. 45-55.
- Rinallo C., Bennici A., Cenni E. Effects of two surfactants on *Triticum durum* // Environmental and experimental botany. 1988. V. 28, N 4. P. 367-374.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Determination of Free Prline for Water Stress Studies // Plant and soil. 1973. V. 39, N 1. P. 205-207.
- Бейли Д. Методы химии белка. М.: Изд-во иностр. лит., 1965. 284 с.

7. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. Алма-Ата: Наука, 1981. 91 с.

8. Паучева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. С. 39-41.

9. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. М.: Колос, 1973. 327 с.

10. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 321-336.

11. Колодяжная Я.С., Коваль В.С. Супрессия активности гена пролиндегидрогеназы повышает неспецифическую устойчивость растений к абиотическим стрессам // Тр. конф. «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности». М., 2007. С. 47.

12. Мирославов Е.А. Структура и функция эпидермиса листа покрытосеменных растений. Л., 1974. С. 63-93.

13. Дорошков А.В., Арсенина С.И., Пшеничникова Т.А., Афонников Д.А. Применение компьютерного анализа микроизображений листа для оценки характеристик опушения пшеницы *Triticum aestivum* L. // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13, № 1. С. 218-226.

### Резюме

Әртүрлі беттік активті заттың (БАЗ) 1% сулы ерітіндісінің бос пролин, белок мөлшеріне, азоттық және энерге-

тикалық метаболизм ферменттердің белсенділігіне және бидайдың анатомиялық құрылышының көрсеткіштер қатарына әсері зерттелді. Жұмысқа бидай Шагала сортының тамыр жүйесіндегі бос пролиннің мөлшері беттік активті заттың әсерінен сенімді түрде жинақталғаны аныкталды. Мутантты линиялар түкымындағы белок мөлшері бастанапқы Шагала және Женіс сорттарымен салыстырыганда 5%-дан 9%-ға дейін артатындығы байқалған. БАЗ әсерінен алынған мутантты линиялар зерттелген ферменттердің белсенділігі бойынша бастанапқы сорттармен салыстырыганда жоғары немесе төмен белсенділікті көрсетті. «Жапырақ түктілігі» белгісі бойынша селекциялық құндылық 1,7,23 және 24 мутантты линияларда байқалған.

### Summary

Action of different 1% surfactants aqueous solution on free proline content in wheat seedlings and activity of a number of nitric and energy metabolism ferments and quantitative characteristics of wheat anatomic structure was studied. Significant accumulation of free proline under the action of surfactants in roots of Shagala sort was showed. It was determined that in some mutant lines protein content increased from 5 to 9% comparing to initial Shagala and Zhenis sorts. Mutants derived using surfactants had high or lower ferment activity comparing to initial sorts. Selective importance using leaf downiness feature had 1,7,23 and 24 mutant lines.