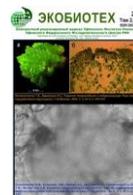




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ЭЛИСИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ОЛИГОХИТОЗАНОМ И МЕЛАНИНОМ

Сушинская Н.В., Чудновская Е.В.,
Майорова К.И., Курченко В.П.

Белорусский государственный университет, Минск,
Республика Беларусь
E-mail: kurchenko@tut.by

Обработка семян кукурузы гибрида Полесский 185 водными растворами с концентрациями: 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01% олигохитозаном (ОХ) с молекулярной массой (ММ): 28,6 kDa стимулирует рост корней и увеличение массы проростков. Меланин, в указанных концентрациях, так же стимулирует ростовые процессы. Обработка семян кукурузы олигохитозаном (0,001 %) в сочетании с меланином (0,001 - 0,005 %) оказывает максимальный стимулирующий эффект на морфометрические показатели проростков на 14 день проращивания. Механизм стимулирования ростовых процессов проростков кукурузы исследованными элиситорами связан с увеличением синтеза стероидных фитогормонов.

Ключевые слова: кукуруза, меланин, хитозан, олигохитозан, элиситор

INFLUENCE OF COMPLEX TREATMENT OF SEEDS OF CORN BY OLIGOHITOZAN AND MELANIN ON GROWTH PROCESSES

Sushinskaya N.V., Chudnovskaya E.V.,
Mayorova K.I., Kurchenko V.P.

Belarussian State University, Minsk,
Republic of Belarus,
E-mail: kurchenko@tut.by

The treatment of Polesky 185 hybrid seeds with aqueous solutions of oligochitosan (OC) with a molecular weight (MW) of 28.6 kDa with concentrations: 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01% resulted in stimulation of root growth and causes an increase in the mass of seedlings. Melanin in the indicated concentrations also stimulates the growth processes. Corn seeds treatment with oligochitosan (0.001%) in combination with melanin (0.001 - 0.005%) showed the greatest stimulating effect on the morphometric parameters of seedlings on the 14th day of vegetation.

Keywords: maize, melanin, chitosan, oligochitosan, elicitor

Поступила в редакцию: 1.08.2019

[DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-279-285](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-279-285)

ВВЕДЕНИЕ

Урожайность кукурузы существенно зависит от климатических условий, влияния фитопатогенных грибов и других факторов. Эта зерновая культура эффективно реализует защитно-приспособительные механизмы и адаптируется к разнообразным стрессовым воздействиям. Фитопатогенные грибы вызывают у растений стресс, который оказывает на растительный организм двойной эффект: повреждающий и раздражающий [Olicón-Hernández et al., 2017]. Стресс-раздражительный эффект фитопатогенных грибов вызывает формирование различных ответных защитных реакций, направленных на репарацию повреждений [Olicón-Hernández et al., 2017; Yarullina et al., 2014]. Эта первичная реакция растительного организма носит неспецифический универсальный характер и связана с генетически закрепленными механизмами устойчивости к среде обитания [Куликов, Варламов, 2008]. Перспективным способом защиты кукурузы от действия абиотических факторов является использование элиситоров, которые индуцируют в растениях неспецифическую иммунную реакцию, вызывая накопления антипатогенных веществ, посредством повышения экспрессии защитных генов [Куликов, Варламов, 2008; Солдатов,

1971; Куликов и др., 2006; Obara et al., 2002]. Основные патогены растений - грибы, многие из которых содержат в клеточных стенках хитин-меланиновый комплекс. Молекулы хитина взаимодействуют со специфическими рецепторами в цитоплазматической мембране растительных клеток, в результате чего они получают химический сигнал о контакте с патогеном.

В связи с этим, в качестве элиситоров можно использовать полученные из грибов очищенные биополимеры: хитозан и меланин. Хитозан является биогенным гетерополимером N-ацетилглюкозамина и глюкозамина, который повышает устойчивость растений к грибным, бактериальным и вирусным заболеваниям. Эффективность его взаимодействия с рецепторами клеток растений зависит от молекулярной массы и соотношения остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина [Куликов, Варламов, 2008; Obara et al., 2002; Bhattacharjee, 2012; Okada, 2002]. Показано, что предпосевная обработка семян сельскохозяйственных культур низкомолекулярными хитозанами (ОХ) стимулирует ростовые процессы и устойчивость к различным заболеваниям [Озерецковская и др., 2002; Rabea et al., 2003; Struszczyk, 2002; Stussel, Leuba, 1984; Raafat et al., 2008]. Проведенные нами исследования по обработке семян кукурузы хитозанами с различной молекулярной массой (ММ) и степенью деацетилирования (СД) выявили, что наиболее эффективным элиситором является ОХ с ММ 28,6 kDa и СА 28,3 % [Kurchenko et al., 2019]. Его взаимодействие с рецепторами клеток стимулирует синтез фитогормонов, в результате чего, масса корней проростков кукурузы на 14 день увеличивается на 260 %. Меланиновые пигменты грибов представляют собой группы нерегулярных высокомолекулярных природных биополимеров полиароматической природы. В зависимости от источника выделения, они содержат различные положительно и отрицательно заряженные функциональные группы, благодаря которым пигмент способен к ионному взаимодействию с отрицательно заряженными поверхностными структурами растительных клеток [Kurchenko et al., 2019]. Такое неспецифическое взаимодействие меланинов с цитоплазматической мембраной клеток может позволить растению фиксировать химический сигнал и включать защитные реакции с разными механизмами запуска и действия.

В связи с вышеизложенным представляется актуальным исследовать элиситорные свойства низкомолекулярного ОХ, меланина и их комплекса при обработке семян кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись семена трёхлинейного гибрида кукурузы Полесский 185. Для выделения меланина использовались наросты вегетативной формы гриба чаги *Inonotus obliquus* (Ach.exPers.). Выделение меланина проводилось по ранее описанной методике [Кукулянская, 2002]. Олигохитозаны производства «Биопрогресс» (Москва, Россия) были получены путем ферментативного гидролиза хитозана ММ 250 kDa и степенью деацетилирования 95 %. После хроматографического разделения полученный ОХ с ММ 28,6 kDa подвергался реацетилированию до 28,3 % N-ацетилглюкозаминных групп.

Семена кукурузы обрабатывались водными растворами олигохитозана с ММ 28,6 kDa и меланина в концентрациях: 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % в течение 1 мин. При комплексной обработке семян кукурузы использовался олигохитозан ММ 28,6 kDa в концентрации 0,001 %, после обработки которым использовался меланин в концентрациях: 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %. Семена проращивались в соответствии с ГОСТ 12038-84 в течение 14 дней в рулонах фильтровальной бумаги при 20 - 22 °С с 16-часовым

светопериодом и освещенностью 12 - 16 тыс. люкс. На 14 день проращивания измерялась длина, масса корней и побегов. После их сублимационной сушки в метанольных экстрактах корней определялись метаболиты с использованием газового хроматографа Agilent 6850, оснащенного масс-детектором 5975В (США). Определялось относительное содержание предшественников фитогормонов в процентах относительно всех идентифицированных веществ. Идентификация веществ основана на сравнении масс-спектров компонентов экстрактов из корней кукурузы с соответствующими данными библиотеки масс-спектров NIST0.5a [Kurchenko et al., 2019]. Эксперименты проводились в трех биологических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние обработки семян кукурузы олигохитозаном на ростовые процессы

Проведенными ранее исследованиями показано [Kurchenko et al., 2019], что при обработке семян кукурузы водными растворами ОХ с концентрациями: 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01 % на 14 день роста растений, наблюдалось увеличение массы проростков, как видно из табл. 1 и рис. 1: А кривая 1. Максимальное увеличение массы проростков достигает 175 % по отношению к контролю при концентрации ОХ 0,001 %. Увеличение массы проростков достигается за счет значительного увеличения массы корневой системы, которая по сравнению с контролем возросла на 257 %. Под влиянием различных концентраций ОХ

Таблица 1. Влияние обработки семян кукурузы водными растворами олигохитозана с молекулярной массой 28,6 кДа, меланином и олигохитозаном (0.001 %) в сочетании с меланином на морфометрические показатели проростков кукурузы на 14 день проращивания

Концентрация раствора	Масса проростков, г	Масса корней, г	Масса побегов, г	Длина корней, см	Длина побегов, см
Обработка семян кукурузы олигохитозаном ММ 28,6 кДа [Kurchenko et al., 2019]					
контроль	1,09±0,05	0,37±0,02	0,72±0,07	12,3±1,1	17,8±1,2
0.0005 %	1,35±0,09	0,81±0,4	0,54±0,03	7,8±0,6	14,9±1,1
0.001 %	1,96±0,1	1,30±0,09	0,66±0,03	13,2±0,9	21,2±1,3
0.005 %	1,66±0,15	1,16±0,08	0,49±0,02	5,6±0,3	16,8±1,1
0.01 %	0,86±0,03	0,22±0,01	0,64±0,03	4,9±0,2	20,6±1,3
Обработка семян кукурузы меланином из чаги					
контроль	0,87±0,04	0,14±0,02	0,7±0,04	3,3±0,24	5,3±0,31
0.0005 %	2,36±0,14	0,46±0,04	1,9±0,07	4,9±0,25	7,3±0,6
0.001 %	2,02±0,18	0,77±0,06	1,25±0,11	4,8±0,27	5,02±0,3
0.005 %	2,19±0,09	0,82±0,07	1,37±0,12	5,2±0,31	6,4±0,04
0.01 %	1,80±0,08	0,37±0,01	1,43±0,13	11,2±0,09	12,5±1,1
Обработка семян кукурузы олигохитозаном ММ 28,6 кДа (0.001 %) и меланином из чаги					
0.0005 %	2,81±0,16	1,05±0,04	1,76±0,08	6,7±0,04	5,9±0,33
0.001 %	2,52±0,18	0,93±0,05	1,59±0,07	4,7±0,27	5±0,3
0.005 %	3,03±0,21	1,20±0,07	1,83±0,09	7,6±0,6	6,4±0,04
0.01 %	2,43±0,16	0,89±0,05	1,54±0,07	5,9±0,3	7,9±0,61

масса побегов не достигает контроля (рис. 1: Г кривая 1), а их длина не превышает его уровень (табл. 1). Соотношение массы корней по отношению к массе побегов возрастает с увеличением концентрации ОХ до 0,005 %, использованного для обработки семян (рис. 1: Б кривая 1). Это свидетельствует о преимущественном увеличении массы проростков за счет роста корней. Соотношение длины корней к их массе значительно уменьшается. Это связано

с увеличением корневой системы проростков, без существенного увеличения длины корней. Анализ результатов, показывает, что по отношению к контролю наибольшими элиситорными свойствами обладает олигохитозан с ММ 28,6 kDa, который после обработки семян кукурузы 0,001 % раствором оказывает максимальное влияние на ростовые процессы.

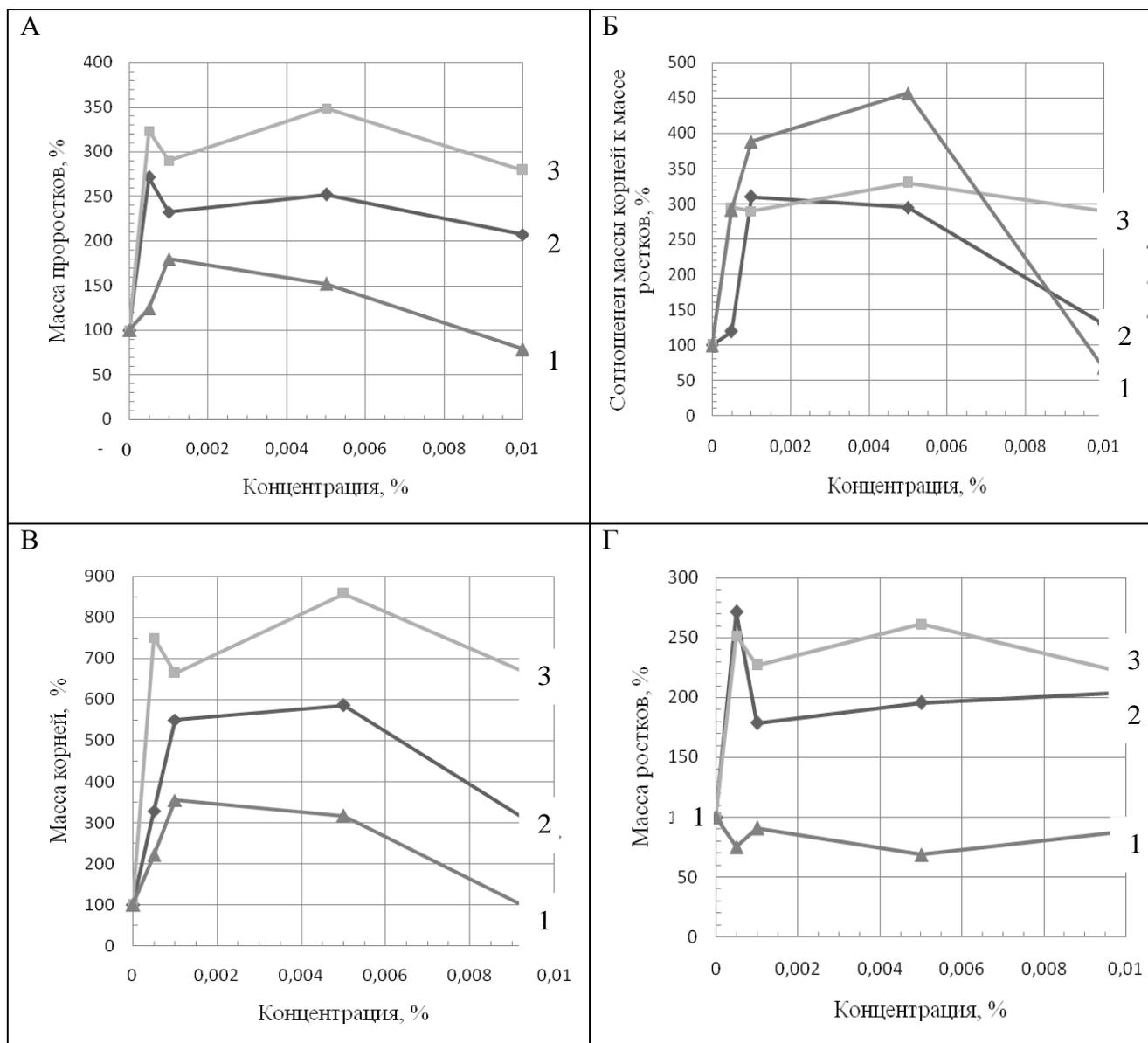


Рис. 1. Влияние обработки семян кукурузы различными концентрациями олигохитозана ММ 28,6 кДа (1), меланина из чаги (2) и комплексной обработки олигохитозаном ММ 28,6 кДа, 0,01 % с последующей обработкой меланином (3) на морфометрические показатели проростков на 14 день проращивания. Масса проростков (А), соотношение массы корней к массе побегов (Б), масса корней (В), масса побегов (Г)

Влияние обработки семян кукурузы меланином на ростовые процессы

Обработка семян кукурузы растворами меланина, в зависимости от концентрации, увеличивает массу проростков на 210 - 275 % по отношению к контролю (рис. 1: А кривая 2). Это увеличение связано со значительным ростом корневой системы, масса которой увеличивается в 4-5 раз (рис. 1: В кривая 2), без существенного увеличения длины корней. Соотношение длины корней к их массе значительно уменьшается. Это связано с увеличением корневой системы проростков, без существенного увеличения длины корней (табл. 1). Увеличение массы побегов в 2-2,7 раза, в зависимости от концентрации меланина

(рис. 1: Г кривая 2), использованного для обработки семян кукурузы менее значительно по сравнению с увеличением массы корней. Соотношение массы корней по отношению к массе побегов достигает максимального значения при концентрации меланина 0,001 %, что свидетельствует о преимущественном увеличении массы проростков за счет роста корней. Таким образом, обработка семян кукурузы растворами меланина в концентрациях 0,001 - 0,005 % оказывает максимальный стимулирующий эффект на морфометрические показатели проростков на 14 день проращивания.

Влияние комплексной обработки семян кукурузы олигохитозаном и меланином на ростовые процессы

Анализ результатов представленных в таблице, показывает, что последовательная обработка семян кукурузы олигохитозаном в концентрации 0,001 % и растворами меланина в различных концентрациях приводит к значительному увеличению массы проростков, корней и побегов по сравнению с контролем (рисунок 1: А, В, Г, кривые 2).

Комплексная обработка семян кукурузы ОХ и меланином стимулирует ростовые процессы, значительно эффективнее, чем обработка использованными индивидуальными элиситорами: меланином и олигохитозаном, см. таблицу 1 и рисунок 1.

Изменение состава вторичных метаболитов в корнях проростков кукурузы, после обработке семян ОХ, меланином и их комплексом

Изменения морфометрических показателей проростков кукурузы, семена которых обрабатывались водными растворами олигохитозана, меланина и ОХ в сочетании с меланином свидетельствуют об участии гормональной регуляции ростовых процессов. Под воздействием использованных элиситоров происходят изменения в составе и содержании метаболитов в клетках проростков кукурузы, что может приводить к увеличению содержания промежуточных метаболитов синтеза фитогормонов: брассиностроидов, абсцизовой кислоты, жасмоновой кислоты и других. Сравнительный анализ вторичных метаболитов в корнях проростков кукурузы, семена которой были обработаны ОХ, меланином и их комплексом с использованием ГЖ-МС позволяет судить о возможных изменениях в их составе и связанных с этим механизмах стимуляции ростовых процессов. Использование ГЖ-МС позволило идентифицировать в экстрактах исследованных образцов корней более 45 метаболитов. Среди этих веществ выявлены промежуточные метаболиты, участвующие в биосинтезе фитогормонов: брассиностероидов, абсцизовой кислоты и других, см. таблица 2.

Таблица 2 Относительное содержание промежуточных метаболитов синтеза фитогормонов в корнях проростков семян кукурузы, обработанных олигохитозаном, меланином и олигохитозаном в сочетании с меланином на 14 день проращивания

Промежуточный метаболит, CAS №	Контроль	Олигохитозан, 0,005%	Меланин, 0,005%	Олигохитозан + меланин, 0,005%
Промежуточные метаболиты синтезов брассиностроидов				
Кампестерол, 474-62-4	5,0	8,3 (+66,7 %)	8,9 (+78,2 %)	9,3 (+85,1 %)
Промежуточные метаболиты синтезов абсцизовой кислоты				
Ликопин, 502-65-8	2,8	3,8 (+35,6 %)	8,9 (+38,0 %)	9,1 (+45,0 %)
Промежуточные метаболиты синтезов жасмоновой кислоты				
Линолевая кислота, 463-40-1	7,5	9,3 (+23,5 %)	8,9 (+18,1 %)	8,7 (+16,2 %)

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении содержания предшественников биосинтеза brassinостироидов и абсцизовой кислоты в корнях проростков кукурузы, обработанных ОХ, меланином и их комплексом. Изменение в содержании линолевой кислоты, которой является предшественником синтеза жасмоновой кислоты менее значительно. Стимулирование ростовых процессов использованными элиситорами связано с биосинтезом стероидных гормонов. Важную роль в ростостимулирующей активности растений играют brassinостероиды, концентрация которых наиболее высока в развивающихся тканях проростков. Наиболее выражен этот процесс при комплексной обработке семян кукурузы ОХ в концентрации 0,001 % и последующей обработке меланином.

Таким образом, обнаруженное элиситорное действие ОХ, меланина и ОХ в сочетании с меланином при обработке семян кукурузы наиболее выражено при их концентрации 0,001 - 0,005 %. Наиболее вероятно, механизм стимулирования ростовых процессов проростков кукурузы исследованными элиситорами связан с увеличением синтеза стероидных фитогормонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olicón-Hernández D.R., Uribe-Alvarez C., Uribe-Carvajal S., Pardo J.P., Guerra-Sánchez G. Response of *Ustilago maydis* against the Stress Caused by Three Polycationic Chitin Derivatives//Molecules, 2017. Vol. 22, No 12. pii: E1745. DOI: [10.3390/molecules22121745](https://doi.org/10.3390/molecules22121745)
2. Yarullina L.G., Veselova S.V., Ibragimov R.I., Shpirnaya I.A., Kasimova R.I., Akhatova A.R., Tsvetkov V.O., Maksimov I.V. Search for Molecular Markers of Wheat Resistance to Fungal Pathogens // Agricultural Sciences, 2014 V. 5, No 8. P. 722-729. DOI: [10.4236/as.2014.58076](https://doi.org/10.4236/as.2014.58076)
3. Куликов С.Н., Варламов В.П. Роль структуры в элиситорной активности хитозана // Ученые записки Казанского государственного университета: Естественные науки, 2008. Т. 150, № 2. С. 43-58.
4. Солдатов, А.Б. Сочетание биологических и химических средств защиты растений. Горки: БСХА, 1971. 14 с.
5. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина Л.В., Лопатин С.Л., Варламов В.П. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224-228.
6. Obara N., Hasegawa M., Kodama O. Induced volatiles in elicitor-treated and rice blastfungus-inoculated rice leaves // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66, No 12. P. 2549–2559. DOI: [10.1271/bbb.66.2549](https://doi.org/10.1271/bbb.66.2549)
7. Bhattacharjee S. The language of Reactive Oxygen speies signalingin plants / S. Bhattacarjee // Jornal of Botany. 2012. V. 2012. Article 985298. DOI: [10.1155/2012/985298](https://doi.org/10.1155/2012/985298)
8. Okada M., Matsumura M., Ito Y., Shibuya N. High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor // Plant Cell Physiol. 2002. V. 43, No 5. P. 505–512. DOI: [10.1093/pcp/pcf060](https://doi.org/10.1093/pcp/pcf060)
9. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений // Хитин и хитозан: получение, свойства и

- при-менение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 339–345.
10. Rabea E.I., Badawy E.I., Stevens M.T., Smaghe C.V., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action // *Biomacromolecules*. 2003. 4. P. 1457–1465. DOI: [10.1021/bm034130m](https://doi.org/10.1021/bm034130m)
 11. Struszczyk, M.H. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan // *Polimery*. 2002. 47. No 6. P. 396–403.
 12. Stussel P., Leuba J.L. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi // *Journal of Phytopathology*. 1984. 111. No 1. P. 82–90. DOI: [10.1111/j.1439-0434.1984.tb04244.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb04244.x)
 13. Raafat D., von Barga K., Haas A., Sahl H.-G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. // *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. Vol. 74, No. 12. P. 3764–3773. DOI: [10.1128/AEM.00453-08](https://doi.org/10.1128/AEM.00453-08)
 14. Kurchenko V.P., Kapustin M.A., Sushinskaya N.V., Chudnovskaya E.V., Mayorova K.I., Tikhonov V.E. Elicitor activity of oligochitosanes with different molecular mass and degree of acetylation when treating seeds of corn // *AIP Conference Proceedings*. 2019. P. 98-103. DOI: [10.1063/1.5087318](https://doi.org/10.1063/1.5087318)
 15. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2002. Т. 38, № 1. С. 68-72