ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ЭЛИСИТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОЛИГОХИТОЗАНОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН КУКУРУЗЫ

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

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

Стимулирование ростовых процессов кукурузы гибрида Полесский 185, семена которого обрабатывались водными растворами с концентрациями: 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01% олигохитозанов (ОХ), зависит от их молекулярной массы (ММ). Олигохитозан с ММ 6,9 kDa угнетает рост корней и побегов по сравнению с контролем. Наибольшее элиситорное действие оказал олигохитозан с ММ 28,6 kDa. Анализ содержания метаболитов, с использованием ГХ-МС, в метанольных экстрактах корней кукурузы на 14 день вегетации, семена которой обрабатывались ОХ с ММ 28,6 kDa показал относительное увеличение содержания промежуточных метаболитов синтеза гормонов: брассиностероидов, абсцизовой кислоты.

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

INFLUENCE OF OLIGOCHITOSANES MOLECULAR MASS ON ELICITOR ACTIVITY WHEN TREATING SEEDS OF CORN

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

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

The effects of treatment of Polessky 185 hybrid maize seeds with 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01% aqueous solutions of oligochitosans (OC) depends on molecular weights (MW) of OC. Oligochitosan with MW of 6.9 kDa inhibits the growth of roots and sprouts as compared with the control. Oligochitosan with a molecular mass of 28.6 kDa had the greatest elicitor effect. Analysis of the content of metabolites using GC-MS in methanol extracts of maize roots on the 14th day of vegetation, the seeds of which were treated with TC with MM 28.6 kDa, showed a relative increase in the content of intermediate metabolites of hormone synthesis: brassinosteroids, abscisic acid.

Keywords: corn, chitosan, oligochitosan, elicitor, degree of acetylation, brassinosteroids

Поступила в редакцию: 1.08.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-273-278](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-273-278)

ВВЕДЕНИЕ

Растущие внедрение органического земледелия в практику сельского хозяйства включает минимальную и «нулевую» обработку почвы, исключение использования различных химических веществ для обработки растений. Это обеспечивает снижение воздействия на окружающую среду и повышает качество продукции. В Республике Беларусь значительную часть пахотных земель занимают посевы кукурузы. Использование принципов органического земледелия при выращивании этой культуры требует исключения обработки семян и растений химическими пестицидами, гербицидами и другими химическими веществами. Устойчивость растений к воздействию абиотических факторов может быть повышена путем предпосевной обработки семян различными регуляторами роста природного происхождения [Куликов, Варламов, 2008; Солдатов, 1971; Куликов и др., 2006; Obara et al., 2002]. Одним из перспективных способов защиты посевов кукурузы от вирусных, бактериальных и грибных болезней является предпосевная обработка семян водорастворимыми низкомолекулярными ОХ [Озерецковская и др., 2002; Rabea et al., 2003; Struszczyk, 2002; Stussel, Leuba, 1984]. Хитозан является биогенным гетерополимером N-

ацетилглюкозамина и глюкозамина. Элиситорная активность ОХ определяется эффективностью их взаимодействия с рецепторами клеток. Количество центров связывания на поверхности плазматической мембраны клеток генетически обусловлено и зависит от вида растения. Избирательность взаимодействия рецепторов к хитозану зависит от их молекулярной массы, соотношения остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина ОХ [Куликов, Варламов, 2008; Obara et al., 2002; Okada et al., 2002]. Высокий аффинитет ОХ может приводить к разнонаправленным процессам биохимических изменений в клетках растений.

В связи с этим, большой теоретический и практический интерес представляет исследование влияния предпосевной обработки семян кукурузы олигохитозанами с различной ММ на рост и развитие растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись семена трёхлинейного гибрида кукурузы Полесский 185. Олигохитозаны производства «Биопрогресс» (Москва, Россия) были получены путем ферментативного гидролиза хитина ММ 250 kDa и степенью деацетилирования 95 %. После хроматографического разделения по ММ полученные ОХ подвергались реацетилированию до необходимого содержания ацетильных групп. Для обработки семян использовались ОХ с различной ММ: 6,9 kDa и 29,8 %; 18,4 kDa и 33,7 %; 28,6 kDa и 28,3 %. Семена кукурузы обрабатывались водными растворами олигохитозанов с концентрациями: 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % в течение 1 мин.

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 определялась длина и 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

При обработке семян кукурузы ОХ с различными молекулярными массами водными растворами с концентрациями: 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % на 14 день роста растений, наблюдались разнонаправленные процессы изменения морфометрических показателей проростков.

Влияние обработки семян кукурузы олигохитозаном с ММ 6,9 kDa на ростовые процессы

Анализ полученных результатов представленных в табл. 1 и на рис. 1, свидетельствует о том, что обработка семян кукурузы возрастающими концентрациями ОХ с ММ 6,9 kDa приводит к снижению массы проростков по отношению к контролю на 57 %, за счет уменьшения массы корней и побегов. При этом, уменьшается длина корней на 27 % и длина побегов 33,1 %. При обработке семян ОХ ММ 6,9 kDa растворами 0,0005 %, 0,001 % соотношение массы корней по отношению к массе побегов уменьшается относительно

контроля за счет увеличения массы побегов и снижения массы корней. Соотношение длины корней к их массе значительно увеличивается. Это связано с уменьшением корневой системы проростков за счет уменьшения массы корней, без существенного изменения их длины.

Таблица 1. Влияние обработки семян кукурузы водными растворами олигохитозанов с различной молекулярной массой на морфометрические показатели проростков кукурузы на 14 день выращивания

Концентрация олигохитозана	Масса проростков, г	Масса корней, г	Масса побегов, г	Соотношение масс корней / побегов	длина корней, см	длина побегов, см	Соотношение длин корней к их массе, см/г
контроль	1,09±0,05	0,37±0,02	0,72±0,07	0,51	12,3±1,1	17,8±1,2	33,4
Олигохитозан ММ 6,9 кДа							
0.0005 %	0,89±0,05	0,19±0,01	0,69±0,07	0,28	10,8±0,9	17,8±1,2	54,8
0.001 %	0,64±0,03	0,12±0,01	0,52±0,03	0,24	9,0±0,4	16,6±1,2	72,6
0.005 %	0,63±0,03	0,24±0,2	0,39±0,02	0,59	9,8±0,4	11,9±1,2	41,7
Олигохитозан ММ 18,4 кДа							
0.0005 %	1,13±0,06	0,74±0,05	0,38±0,02	1,93	12,3±1,1	17,8±1,3	16,5
0.001 %	1,35±0,07	0,46±0,05	0,89±0,04	0,52	14,5±1,2	21,9±1,4	31,3
0.005 %	0,92±0,05	0,35±0,01	0,57±0,03	0,61	19,8±1,3	25,0±1,6	56,24
0.01 %	1,44±0,05	0,47±0,02	0,98±0,05	0,48	16,6±1,1	19,7±1,1	35,68
Олигохитозан ММ 28,6 кДа							
0.0005 %	1,35±0,09	0,81±0,4	0,54±0,03	1,49	7,8±0,6	14,9±1,1	9,68
0.001 %	1,96±0,1	1,30±0,09	0,66±0,03	1,98	13,2±0,9	21,2±1,3	10,11
0.005 %	1,66±0,15	1,16±0,08	0,49±0,02	2,33	5,6±0,3	16,8±1,1	4,82
0.01 %	0,86±0,03	0,22±0,01	0,64±0,03	0,35	4,9±0,2	20,6±1,3	22,67

Изменение морфометрических показателей проростков кукурузы, семена которых обрабатывались ОХ с ММ 18,4 кДа.

Обработка семян кукурузы возрастающими концентрациями ОХ с ММ 18,4 кДа не приводит к значительному снижению массы проростков по отношению к контролю, табл. 1 и рис. 1. Обработка семян этим ОХ приводит к уменьшению длины корней, без существенного изменения их массы. При этом соотношение длины корней к их массе близко к контролю.

Рис. 1. Влияние различных концентраций олигохитозанов, имеющих молекулярные массы 6,9 кДа; 18,4 кДа; 28,6 кДа, на массу корней в % (А) и длину корней в % (Б) по отношению к контролю

Относительно контроля обработка семян ОХ ММ 18,4 kDa не приводит к значительному изменению соотношения массы корней по отношению к массе побегов, что свидетельствует о низкой элиситорной активности этого олигохитозана.

Стимулирование ростовых процессов проростков кукурузы, семена которых обрабатывались ОХ с ММ 28,6 кДа

Анализ результатов, показывает, что по отношению к контролю наибольшими элиситорными свойствами обладает олигохитозан с ММ 28,6 kDa, который после обработки семян кукурузы оказывает максимальное влияние на ростовые процессы. Обработка семян кукурузы возрастающими концентрациями ОХ с ММ 28,6 kDa приводит к увеличению массы проростков. При концентрации ОХ 0,001 % это увеличение составляет 79,8 % и достигается за счет массы корней. При этом, увеличение массы корней достигает 257 %, а их длина увеличивается на 160 %. Соотношение длины корней к их массе значительно уменьшается. Это связано с увеличением корневой системы, без значительного изменения их длины.

Таким образом, соотношение масс корней по отношению к массе побегов возрастает с увеличением ММ использованных ОХ. Это свидетельствует о преимущественном увеличении массы проростков за счет роста корней. Соотношение длины корней к их массе значительно уменьшается, что связано с увеличением корневой системы проростков, без существенного увеличения длины корней. Наибольшее элиситорное действие на морфометрические показатели проростков оказал олигохитозан с ММ 28,6 kDa в концентрации 0,001 %.

Изменение в содержании предшественников фитогормонов в корнях проростков кукурузы, семена которой обрабатывались растворами низкомолекулярных хитозанов

Морфофизиологические изменения проростков, вызванные обработкой семян кукурузы ОХ, которые различаются ММ связаны с гормональной регуляцией ростовых процессов и другими биохимическими факторами. Использование ГХ-МС позволило идентифицировать в экстрактах исследованных образцах корней и побегов более 45 метаболитов. Среди этих веществ выявлены промежуточные метаболиты, участвующие в биосинтезе гормонов: брассиностероидов, абсцизовой кислоты и других гормонов, см. табл. 2.

Таблица 2. Относительное содержание промежуточных метаболитов синтеза фитогормонов в корнях проростков семян кукурузы, обработанных олигохитозанами на 14 день проращивания

Промежуточный метаболит, CAS №	Контроль	Олигохитозан ММ 6,9 kDa, 0,005%	Олигохитозан ММ 18,4 kDa, 0,005%	Олигохитозан ММ 28,6 kDa, 0,005%
Промежуточные метаболиты синтезов брассиностироидов				
Кампестерол, 474-62-4	5,0	4,25 (-15,0%)	5,5 (+10,0%)	8,3 (+66,7%)
Промежуточные метаболиты синтезов абсцизовой кислоты				
Ликопин, 502-65-8	2,8	2,3 (-18,0%)	2,5 (-10,0%)	3,8 (+35,6%)
Промежуточные метаболиты синтезов жасмоновой кислоты				
Линолевая кислота, 463-40-1	7,5	6,0 (-20,0%)	7,9 (+5,0%)	9,3 (+23,5%)

Показано, что после предпосевной обработки семян кукурузы ОХ с различной молекулярной массой на 14 сутки выращивания в метанольных экстрактах корней происходят разнонаправленные синтезы предшественников фитогормонов. Низкомолекулярный ОХ с ММ 6,9 кДа снижает содержание кампестерола, ликопина и линолевой кислоты, которые являются предшественниками брассиностероидов, абсцизовой кислоты и жасмоновой кислоты. Вероятно, это снижение приводит к замедлению роста корней и побегов, а так же уменьшению массы проростков. На 14 сутки выращивания кукурузы, под влиянием ОХ с ММ 28,6 кДа, в метанольных экстрактах корней повысилась относительное содержание кампестерола на 60,7 %, который является основным промежуточным метаболитом синтеза брассиностероидов. Его увеличение говорит об активации синтеза этого фитогормона. Он необходим для роста, развития растений и способен стимулировать ростовые процессы, а так же повышает устойчивость растений к стрессовым воздействиям. Кроме того, увеличивается содержание в экстрактах промежуточных метаболитов синтеза абсцизовой кислоты и жасмонатов. Наиболее вероятно, механизм стимулирования ростовых процессов проростков кукурузы исследованным ОХ с ММ 28,6 кДа, связан с увеличением синтеза стероидных фитогормонов.

Таким образом, обнаруженное элиситорное действие ОХ при обработке семян кукурузы наиболее выражено с увеличением их молекулярной массы. Их активность проявляется в значительном увеличении массы корней проростков кукурузы на 14 день роста. Полученные данные указывают на важную роль молекулярной массы олигохитозанов в проявлении ими элиситорных свойств при предпосевной обработке семян кукурузы. Возможность искусственного регулирования с использованием олигохитозанов содержания фитогормонов и активности защитных белковых молекул открывает принципиально новые подходы к поиску и созданию новых экологически безопасных препаратов, стимулирующих естественные механизмы роста и развития растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений // Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 339–345.
4. Солдатов, А.Б. Сочетание биологических и химических средств защиты растений. Горки: БСХА, 1971. 14 с.
5. Kurchenko V.P., Kapustin M.A., Sushinskaya N.V., Chudnovskaya E.V., Mayorova K.I., Tikhonov V.E. Elicitor activity of oligohytosanes 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)

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. 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)
8. Rabea E.I., Badawy E.I., Stevens M.T., Smagghe 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)
9. Struszczyk, M.H. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan // Polimery. 2002. 47. No 6. P. 396–403.
10. 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)