

УДК 581.17

ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

**Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Республика Беларусь*



Яронская Елена Брониславовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси.

Научные интересы были связаны с исследованием биофизических и биохимических механизмов регуляции внутриклеточных процессов в растительной клетке.



Аверина Наталия Георгиевна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Института биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
e-mail: averina@ibp.org.by

Научные интересы связаны с исследованием биофизических и биохимических механизмов регуляции внутриклеточных процессов в растительной клетке.



***Кисель Михаил Александрович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
e-mail: kisel@iboch.bas-net.by

Научные интересы связаны с исследованием химических и биологических свойств липидов как компонентов биологических мембран и сигнальных молекул.

Главной задачей, стоящей в настоящее время перед сельским хозяйством, является интенсификация отраслей агропромышленного комплекса, которая предусматривает увеличение производства сельскохозяйственной продукции. Одним из факторов интенсивного земледелия является применение регуляторов роста и средств защиты, повышающих продуктивность и устойчивость растений к неблагоприятным условиям внешней среды. В настоящее время для стимуляции роста и развития сельскохозяйственных культур и, как следствие, повышения их урожайности применяют различные химические вещества и составы из них в совокупности с природными. Наиболее экологичным считается применение регуляторов роста на основе природных фитогормонов. Однако ряд растительных гормонов по своим физиологическим функциям соответствует гормонам животных и человека, что подтверждается данными относительно их биосинтеза, и тем самым ставится под вопрос безопасность их применения. Указанные выше аналоги природных фитогормонов имеют невысокую эффективность и отмечены только как стимуляторы роста, что связано с органоспецифичностью их действия.

Принципиально новым подходом к созданию экологически чистых регуляторов роста растений является использование для этих целей естественных метаболитов самих растений, в частности 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК). АЛК является предшественником всех циклических (хлорофиллов (Хл), гемов, корриноидов) и линейных (билинов, фикобилинов) тетрапирролов, которые играют центральную роль в метаболизме растительных, животных и бактериальных организмов [1]. В конце 80-х годов прошлого столетия нами впервые было обнаружено, что АЛК обладает свойствами регулятора роста растений [2–4]. Механизмы, обеспечивающие росторегулирующую активность АЛК, в настоящее время интенсивно изучаются [см. обзоры 5, 6].

Чрезвычайно интересным оказалось то, что при обработке растений экзогенной АЛК в них в несколько раз возрастал уровень эндогенных цитокининов [7]. В качестве рабочей гипотезы был предложен механизм вторичного использования продуктов катаболизма экзогенной АЛК в синтезе пуринового кольца, которое составляет основу цитокининов [3] – рисунок 1. Индукция накопления цитокининов под действием АЛК может объяснить наблюдаемое многообразие ответов растений на ее применение [6] и, по-видимому, является определяющим механизмом в ее росторегулирующей активности. Полученные результаты открыли возможность управлять ростом и развитием растений с помощью АЛК путем направленного изменения уровня эндогенных цитокининов.

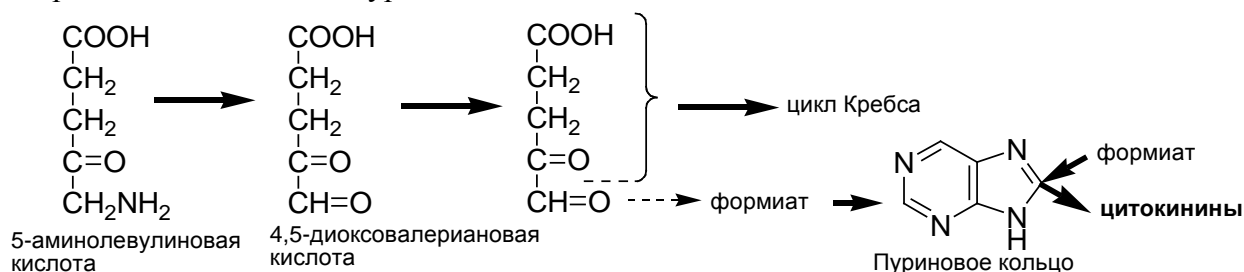


Рисунок 1 – Гипотетическая схема катаболизма 5-аминолевулиновой кислоты в растениях [3]

Имеющиеся в литературе сведения о том, что экзогенная АЛК оказывает стимулирующее действие на рост и урожайность сельскохозяйственных культур получены в основном для тропических и субтропических культур [5, 8–10].

Представляло значительный интерес изучить действие экзогенной АЛК на рост и развитие сельскохозяйственных культур, возделываемых на территории Республики Беларусь, в частности, ячмень и лен-долгунец.

В качестве объектов исследования использовали растения ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт «Гонар») и льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L., сорт «Блакит»). Обработку проростков ячменя АЛК или гексиловым эфиром АЛК (ГЭ-АЛК) осуществляли путем опрыскивания 0,06; 0,12 и 0,6 ммоль/л растворами с добавлением твин-80 (0,1%). Предпосевную обработку семян ячменя проводили путем их замачивания в растворах АЛК в течение 5 ч, либо методом инкрустации [11–13] составом, содержащем протравитель байтан-универсал (2 кг/т семян), пленкообразователь гисинар (100 г/т семян) и АЛК или ГЭ-АЛК. В лабораторных условиях растения выращивали в вегетационных сосудах при 14-часовом фотопериоде (450 мкмоль фотонов/м²·с) и температуре 23±2°С. Полевые мелкоделяночные испытания (площадь делянки 1 м²) проводили на экспериментальном поле ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» в 4-кратной повторности. Количество хлорофиллов а+в (Хл) и каротиноидов оценивали по спектрам поглощения 80%-ных ацетоновых экстрактов листьев (спектрофотометр UVIKON 931, Германия) [14]. Содержание моно- и дисахаридов в листьях измеряли по методу Ермакова и др. [15], который основан на изменении окраски раствора глицерата меди при кипячении его с вытяжками сахаров. Оптическую плотность растворов регистрировали при λ=630 нм на спектрофотометре UVIKON 931. Содержание белка в листьях определяли по методу Брэдфорд [16], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Активность аскорбатпероксидазы (АПР)

и глутатионредуктазы (ГТР) анализировали по методам, описанным в работах [17, 18] соответственно.

Растения ячменя белорусской селекции (сорт «Гонар»), обрабатывали АЛК (0,06–0,6 ммоль/л) либо путем опрыскивания листовой поверхности, либо путем замачивания семян. При этом было показано ускорение развития растений, увеличение сырой массы их надземной части, содержания белка в листьях и активности антиоксидантных ферментов – АПР и ГТР – рисунок 2.

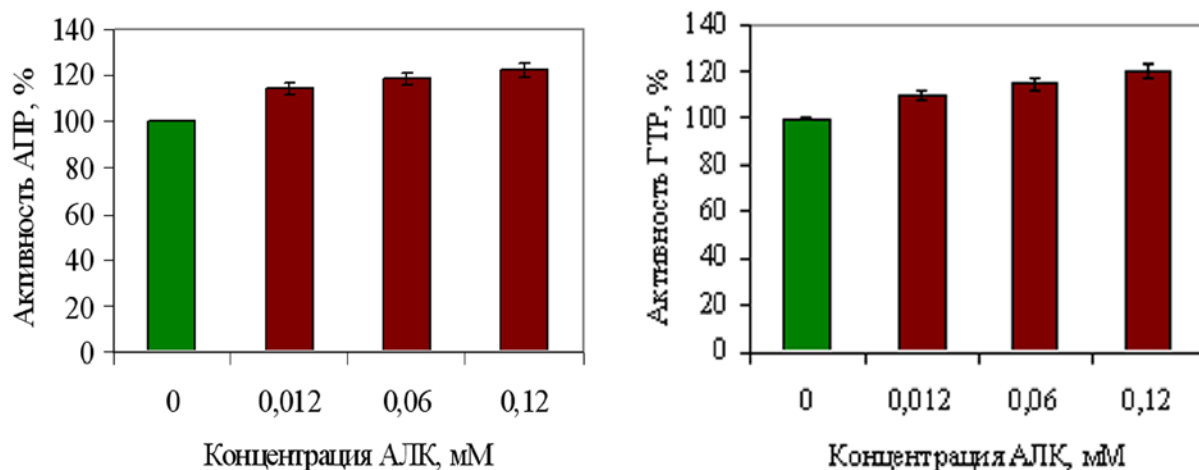


Рисунок 2 – Активность аскорбат пероксидазы (АПР) и глутатионредуктазы (ГТР) в листьях 5-дневных зеленых растений ячменя, обработанных на стадии семян растворами АЛК. За 100% принята активность АПР и ГТР в листьях растений ячменя, семена которых замачивали перед посадкой в воде

Инкрустация семян ячменя составом, в котором наряду с протравителем «байтан-универсал» и пленкообразователем «гисинар» была включена АЛК (0,12–1,2 ммоль/л), повысила всхожесть (на 11–18%) и энергию прорастания (на 15–38%) (рисунок 3) семян, ускорила фазу кушения проростков, увеличила их высоту (на 16–28%), массу надземной части (на 7–21%) и общую кустистость растений (на 3–33%). В листьях отмечено повышенное содержание Хл (на 18–57%), каротиноидов (на 8–38%), белка (на 15–35%) и свободных сахаров (на 35–96%) – таблица 1.

В полевых испытаниях (мелкоделяночные опыты) такая обработка обеспечила прибавку урожайности ячменя на 23–26%. При возрастании продуктивной кустистости и озерненности колосьев вес 1000 семян оставался неизменным. Полученные результаты свидетельствуют о высокой росторегулирующей активности АЛК.

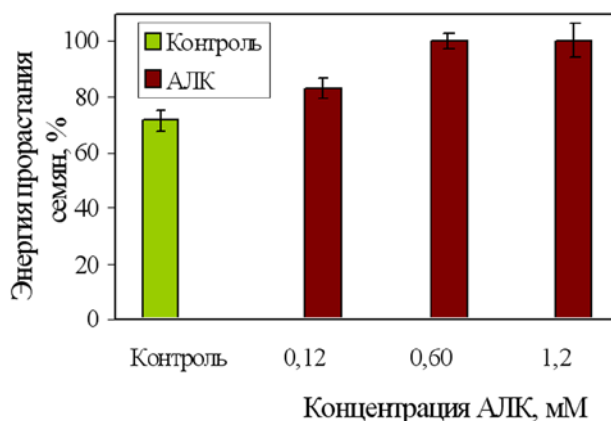
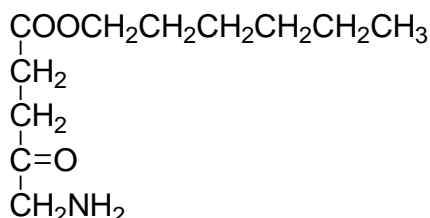


Рисунок 3 – Энергия прорастания семян ячменя, обработанных инкрустирующим составом, содержащим АЛК. За 100% принято общее количество проростков в каждом варианте. Семена контрольных растений (Контроль) инкрустированы фунгицидом «байтан-универсал» и пленкообразователем «гисинар»

Таблица 1 – Содержание Хл, каротиноидов, белка и свободных сахаров (мг/г сырой массы) в растениях ячменя, семена которых были инкрустированы 0,12; 0,6 и 1,2 ммоль/л растворами АЛК. За 100% принято содержание пигментов, белка и свободных сахаров в листьях контрольных растений, семена которых были инкрустированы фунгицидом «байтан-универсал» и пленкообразователем «гисинар».

	Контроль	АЛК		
		0,12 ммоль/л	0,6 ммоль/л	1,2 ммоль/л
Хл (46-дн. проростки)	1,22±0,13 (100%)	1,23±0,09 (100%)	1,44±0,10 (118%)	1,91±0,08 (157%)
Каротиноиды (46-дн. проростки)	0,13±0,01 (100%)	0,12±0,01 (100%)	0,14±0,01 (108%)	0,18±0,01 (138%)
Белок (6-дн. проростки)	16,1±0,8 (100%)	17,4±1,0 (115%)	20,1±0,9 (125%)	21,7±0,9 (135%)
Свободные сахара (5-дн. проростки)	3,10±0,15 (100%)	4,21±0,31 (135%)	6,09±0,88 (196%)	5,28±0,91 (170%)

Так как АЛК является гидрофильным соединением, она плохо проникает через клеточные мембраны, что приводит к необходимости использования высоких доз при ее применении. В работах на клетках животных было показано, что эффективность АЛК в фотодинамической диагностике существенно повышается при применении ее в виде эфиров с высшими спиртами [19]. В связи с этим нами был осуществлен синтез липофильного производного АЛК – ее гексилового эфира (ГЭ-АЛК), с целью повышения способности препарата проникать в растение [20, 21]. Липофилизация АЛК увеличила (в 2–5 раз) проникновение действующего вещества в растительную клетку, снизила дозу его расхода и тем самым себестоимость. Наряду с этим в растении ГЭ-АЛК медленно гидролизировался до АЛК, что позволяло поддерживать ее определенный уровень в растительной ткани в течение длительного времени. Структурная формула ГЭ-АЛК приведена ниже.



Инкрустация семян ячменя ГЭ-АЛК в концентрации 0,12–1,2 ммоль/л вызывала повышение их всхожести (на 13–18%) и энергии прорастания (на 38%), увеличение высоты проростков (на 40–45%), ускорение фазы кущения (рисунок 4), общей кустистости растений (на 23–35%) и сырой массы их надземной части (на 15–28%). Обработка ГЭ-АЛК повышала в листьях содержание Хл (на 28–43%), каротиноидов (на 28–35%), белка (на 20–32%) и свободных сахаров (на 52–90%) – таблица 2. В целом инкрустация семян ГЭ-АЛК (0,012 ммоль/л) обеспечила прибавку урожайности ячменя в полевых опытах на 28%, а при использовании 0,12 ммоль/л ГЭ-АЛК – на 47%.

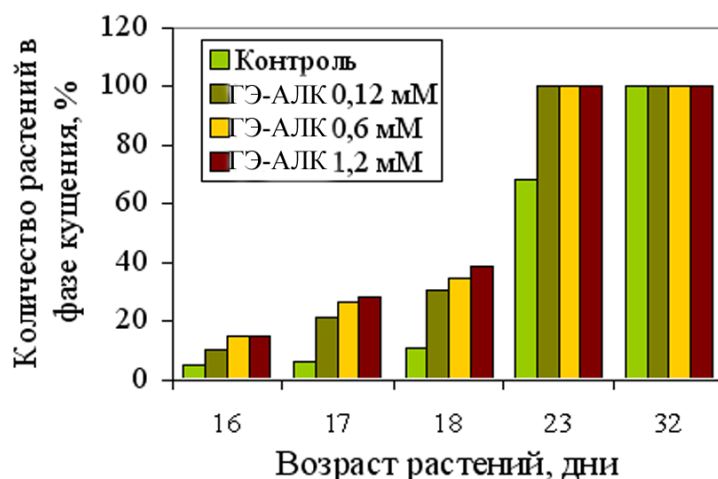


Рисунок 4 – Влияние ГЭ-АЛК на начало фазы кущения у растений ячменя. За 100% в каждом варианте принято общее количество растений. Семена контрольных растений (Контроль) инкрустированы фунгицидом «байтан-универсал» и пленкообразователем «гисинар»

Таблица 2. – Содержание Хл, каротиноидов, белка и свободных сахаров (мг/г сырой массы) в растениях ячменя, семена которых были инкрустированы 0,12; 0,6 и 1,2 ммоль/л растворами ГЭ-АЛК.

	Контроль*	ГЭ-АЛК		
		0,12 ммоль/л	0,6 ммоль/л	1,2 ммоль/л
Хл (46-дн. проростки)	1,22±0,13 100%	1,65±0,09 135%	1,56±0,08 128%	1,74±0,09 143%
Каротиноиды (46 дн. проростки)	0,13±0,01 100%	0,17±0,01 131%	0,16±0,01 128%	0,18±0,02 135%
Белок (6-дн. проростки)	16,1±0,8 100%	19,3±1,0 120%	20,1±1,3 125%	21,3±1,5 132%
Свободные сахара (5 дн. проростки)	3,10±0,15 100%	5,91±0,49 190%	5,02±0,58 162%	4,72±0,57 152%

Примечание: * за 100% принято содержание Хл, каротиноидов, белка и свободных сахаров в листьях контрольных растений, семена которых были инкрустированы фунгицидом «байтан-универсал» и пленкообразователем «гисинар».

Предпосевная обработка семян льна-долгунца АЛК и ГЭ-АЛК в концентрации 0,12; 0,6 и 1,2 ммоль/л увеличивала к концу вегетации общую длину растений на 2,5–9,7 см (рисунок 5). Техническая длина возрастала на 1,0–1,7 и 1,7–5,5 см при применении АЛК и ГЭ-АЛК, соответственно. В опытных вариантах отмечалось увеличение количества коробочек на растениях (на 12–69%) и количества семян в коробочке (на 7–21%), а также тенденция к увеличению массы 1000 семян. В итоге была получена прибавка по урожайности семян, которая была особенно значительна в случае использования ГЭ-АЛК и составляла 2,5; 6,4 и 10,5 ц/га по отношению к контролю со средней урожайностью 11,3 ц/га при концентрации 0,12; 0,6 и 1,2 ммоль/л соответственно. Полученные результаты показали, что использование инкрустирующих составов, содержащих АЛК или ГЭ-АЛК, может стать эффективным способом увеличения семенной продуктивности льна-долгунца и качества льноволокна.

Список литературы:

1. Beale, S.I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis / S.I. Beale // *Photosynth. Res.* – 1999. – Vol. 60, № 1. – P. 43–73.
2. Аверина, Н.Г. Об участии 5-аминолевулиновой кислоты в регуляции роста растений / Н.Г. Аверина, Е.Б. Яронская // Докл. Акад. наук БССР. – 1988. – Т. 32, № 10. – С. 952–955.
3. Аверина, Н.Г. Изучение влияния 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя / Н.Г. Аверина, Е.Б. Яронская // Физиол. растен. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 916–920.
4. Averina, N.G. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth / N.G. Averina, E.B. Yaronskaya // *Photosynthetica.* – 1991. – Vol. 25, № 1. – P. 27–31.
5. Sasaki, K. Hydrogen and 5-aminolevulinic acid production by photosynthetic bacteria / K. Sasaki // *Biohydrogen* / Ed. By O. R. Zaborsky. – New York. – 1998. – P. 133–142.
6. Аверина, Н.Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н.Г. Аверина, Е.Б. Яронская // Мн., «Беларуская навука». – 2012. – 413 с.
7. Яронская, Е.Б. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты / Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, Н.Г. Аверина // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2004. – № 3. – С. 70–73.
8. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content and plant growth / Y. Hotta [et al.] // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1997. – Vol. 61, № 12. – P. 2025–2028.
9. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops / Y. Hotta [et al.] // *Plant Growth Regul.* – 1997. – Vol. 22, №1. – P.109–114.
10. Roy, C.B. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjung*, *V. mungo*, *V. radiata* / C.B. Roy, M. Vivekanandan // *Biol. Plantarum.* – 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 211–215.
11. Кабашникова, Л.Ф. Способ ранней диагностики эффективности многокомпонентных капсулирующих составов для обработки семян. Методические указания / Л.Ф. Кабашникова, Мн.: ИООО “Право и экономика”, 2003. – 31 с.
12. Ламан, Н.А. Современная технология предпосевной обработки семян / Н.А. Ламан, Г.Н. Алексейчук, Ж.Н. Калацкая // Наука и инновации. – 2006. – № 9. – С. 37–41.
13. Привалов, Ф.И. Влияние предпосевной обработки семян на производство продукции растениеводства / Ф.И. Привалов // Биологизация приемов в технологиях возделывания зерновых культур / Ф.И. Привалов; под ред. Л.П. Круля. – Несвиж: «Несвиж. укруп. тип. им. С. Будного», 2007. – Гл. 2. – С. 47–78.
14. Шлык, А.А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* / А.А. Шлык // Биохимия. – 1968. – Т. 33, № 2. – С. 275–285.
15. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.]; под ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л., 1987. – 430 с.
16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
17. Nakano, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant Cell Physiol.* – Vol. 22, № 5. – P. 867–880.
18. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum* / M. Aono [et al.] // *Plant Physiol.* – Vol. 107, № 2. – P. 645–648. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study / N. Lange [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 80, № 1 – 2. – P. 185–193. – Стимуляция роста и развития растений ячменя липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / С.Г. Спивак, Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, В.Ю. Давыдов, И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, Н.Г. Аверина, М.А. Кисель // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95–99.

ENVIRONMENTALLY-FRIENDLY PLANT GROWTH REGULATORS BASED ON

5-AMINOLEVULINIC ACID**E.B. Yaronskaya, N.G. Averina, M.A. Kisel****Institute of Biophysics and Cell Engineering of Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

Modern plant cultivation faces complicated problems caused by increase of the world population under constant shortage of arable land as a result of urbanization, salinity of cultivated land, global climatic changes on the planet and other factors. By the year 2020 the area of cultivated land per one inhabitant of the planet will decrease twice as compared to the year 1980. Hence the annual increasing consumption of food, energy and fibre should be satisfied with increasing agricultural crop productivity. Therefore the main task of the modern agricultural sciences is intensification of agro industrial complex spheres to increase yield of agricultural products. One of the factors of plant cultivation strengthening is utilization of plant growth regulators and chemical plant protectors to increase plant productivity and to withstand to the unfavourable factors of the environment.

Considerable recent attention has been focused on the chlorophyll and heme precursor – 5-aminolevulinic acid (ALA) which in low concentrations acts as plant growth regulator and improves plant tolerance to different harmful stressors. Mechanisms of such ALA action are still poorly understood and intensively are studied. We have shown that in plants treated with ALA the level of endogenous phytohormone cytokinins significantly increased. It was elaborated the work hypothesis that products of ALA catabolism are involved in formation of purine ring that is a basis of cytokinin molecules. Induction of cytokinin accumulation under ALA action could explain the variety of physiological and biochemical plant responses to its application and open a possibility to control growth and development of plants with exogenous ALA through change the level of endogenous cytokinins.

The literature information about plant productivity stimulation with exogenous ALA is mainly presented for tropical and subtropical plants. We carried out comparative investigation of impact of low concentration of ALA and its lipophylic derivative substance – hexyl ester (HE-ALA) on growth, development and some physiological and biochemical characteristics of agricultural plants cultivated on the territory of Belarus such as barley and long-fiber flax.

Barley seedlings were sprayed with 0,06; 0,12 and 0,6 mmol/l ALA and HE-ALA. This compounds were applied also at concentration 0,12–1,2 mmol/l by means of pre-sowing incrustation of barley and flax seeds. Both ALA and HE-ALA was shown to increase the germinating capacity (by 18%) and the germinating energy (by 38%) of barley seeds, the length of barley plants (by 16–40%), to accelerate the tillering stage, to increase the biomass of the overground part of plants (by 20–28%), the tilling capacity (by 23–35%) and the productive tilling capacity of barley (by 11–18%). ALA and HE-ALA had promotive effect on the content of chlorophyll (18–57%), carotenoids (28–38%), proteins (20–35%) and soluble sugars (35–96%) in barley leaves. Pre-sowing treatment of seeds with ALA and HE-ALA significantly increased the yield of barley and flax. While plant growth regulating properties of ALA was detected at 0,6–1,2 mmol/l, the stimulatory action of HE-ALA became apparent at lower concentration – 0,12 mmol/l. The effect observed was caused to facilitated penetration of the lipophilic derivative of ALA into the plant cells.