

УДК 577.112.3:632.9

С. Г. СПИВАК<sup>1</sup>, Е. Б. ЯРОНСКАЯ<sup>2</sup>, И. В. ВЕРШИЛОВСКАЯ<sup>2</sup>, В. Ю. ДАВЫДОВ<sup>1</sup>,  
И. В. ТРОСТЯНКО<sup>1</sup>, В. И. ДОЛГОПАЛЕЦ<sup>1</sup>, Н. Г. АВЕРИНА<sup>2</sup>, М. А. КИСЕЛЬ<sup>1</sup>

### СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ ЛИПОФИЛЬНЫМИ ЭФИРАМИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком Ф. А. Лахвичем)

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск,

Поступило 11.06.2007

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

**Введение.** Известно, что экзогенная 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) в высоких концентрациях (более 10 мМ) обладает свойствами фотодинамического гербицида [1, 2], а в низких (0,06–0,6 мМ) проявляет свойства регулятора роста и развития растений и оказывает стимулирующее действие на рост и урожайность ряда сельскохозяйственных культур, таких как рис, фасоль, картофель и др. [3–6].

Однако широкое применение АЛК как экологически безопасного регулятора роста и развития растений ограничивается ее высокой стоимостью. Экономическая целесообразность использования АЛК в сельском хозяйстве может быть достигнута за счет липофилизации молекулы, приводящей к увеличению эффективности проникновения препарата в клетки растений, и как следствие, к существенному снижению применяемых доз.

Цель данной работы – изучить способность АЛК и ее липофильных производных – эфиров высших спиртов, проникать в растительные клетки, оказывать росторегулирующее действие, а также влиять на содержание фотосинтетических пигментов и белков в растениях.

**Материалы и методы исследования.** Гексилловый (Г-АЛК) и октиловый (О-АЛК) эфиры АЛК синтезировали по следующей методике. К суспензии, содержащей 6,50 г АЛК в 30 мл соответствующего спирта, прибавляли по каплям 7,13 мл хлористого тионила при охлаждении до 0 °С. Смесь перемешивали при этой температуре на протяжении 1 ч, а затем 6 ч при 80 °С до образования прозрачного раствора. После охлаждения до комнатной температуры смесь выливали в 325 мл диэтилового эфира и оставляли на ночь при –40 °С. Выпавший осадок отфильтровывали. Выход Г-АЛК и О-АЛК составлял 95 и 65% соответственно.

Объектом исследования служили растения ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт «Гонар») и 4–5-дневные этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum*, сорт «Амброзия»). Растения ячменя выращивали в вегетационных сосудах в режиме 14 ч света/10 ч темноты при температуре 23±2 °С. Перед высевом семена инкрустировали смесью, содержащей фунгицид «Байтан-универсал» (2 кг/т), пленкообразователь «Гисинар» (100 г/т), АЛК или Г-АЛК в концентрации 0,012; 0,12; 0,6; 1,2 мМ. В качестве контроля использовали семена, обработанные инкрустирующей смесью без добавления 5-АЛК или Г-АЛК. Сравнительное исследование способности АЛК и Г-АЛК проникать в клетки растений ячменя проводили на листьях 7-дневных растений, которые инкубировали в чашках Петри в темноте в течение 38 ч на 0,6 мМ растворах данных соединений с добавлением 50 мМ левулиновой кислоты (ЛК) в 0,1 М Трис-НСl-буфере (рН 6,5). Экстракцию АЛК проводили, как описано в работе [7]. Образцы, содержащие АЛК, конденсировали с ацетилацетоном в течение 15 мин при 100 °С, после чего к ним добавляли модифицированный реактив Эрлиха, и количество АЛК определяли спектрофотометрически при длине волны 553 нм, используя молярный коэффициент экстинкции  $6,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [8]. Этиолированные проростки гороха, инкубировали в течение 3 и 12 ч в темноте в водных растворах АЛК, Г-АЛК и О-АЛК в концен-



трациях от 0,003 до 3 мМ и определяли содержание АЛК в экстрактах. Экстрагированные вещества разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и в зонах, совпадающих по хроматографической подвижности с аутентичными свидетелями, определяли содержание АЛК по методу [7]. Содержание фотосинтетических пигментов – хлорофилла (Хл) и каротиноидов, в экстрактах из листьев определяли спектрофотометрически [9]. Содержание белка в гомогенатах анализировали согласно [10].

Приведенные в таблицах и на рисунках данные представляют собой средние арифметические величины трех экспериментов и их стандартные ошибки.

**Результаты и их обсуждение.** Эффективность действия АЛК и Г-АЛК на рост и развитие растений ячменя определяли, используя такие показатели, как всхожесть и энергия прорастания семян, высота проростков, начало фазы кущения, кустистость, масса надземной части растения, продуктивная кустистость.

Установлено, что инкрустирование семян АЛК и Г-АЛК приводит к повышению показателя всхожести семян по сравнению с контролем. Так, в контроле число всхожих семян составляло 77% от их исходного количества (табл. 1). Обработка семян АЛК в концентрациях 0,12; 0,6 и 1,2 мМ вызывала повышение показателя всхожести семян до 80, 88 и 95% соответственно. Максимальное увеличение всхожести семян в вариантах с Г-АЛК наблюдалось при концентрации этого вещества 0,12–0,6 мМ.

Т а б л и ц а 1. Влияние АЛК и Г-АЛК на морфометрические параметры растений ячменя

Параметры	Контроль	АЛК (мМ)				Г-АЛК (мМ)			
		0,012	0,12	0,6	1,2	0,012	0,12	0,6	1,2
Всхожесть семян, %	77	н. а.	80	88	95	н. а.	90	95	94
Энергия прорастания семян, %	36	80	83	100	н. а.	99	97	100	н. а.
Высота 5-дневных растений, %	100	124	120	144	н. а.	145	140	140	н. а.
Общая кустистость 46-дневных растений, %	100	н. а.	104	133	133	н. а.	135	130	123
Надземная фитомасса 46-дневных растений, %	100	н. а.	112	124	107	н. а.	128	120	115

**П р и м е ч а н и е.** Контролем служили растения, семена которых инкрустировали фунгицидом «Байтан-универсал (2 кг/т) и пленкообразователем «Гисинар» (100 г/т). Для параметра всхожести семян за 100% в каждом варианте принято общее количество инкрустированных семян. Параметр энергии прорастания семян отражает количество проростков через 4 дня после высева семян в почву (100% – общее количество проростков в каждом варианте). Для остальных параметров, приведенных в таблице, за 100% приняты их величины в контрольном варианте. Приведены средние значения из трех экспериментов. Величины стандартных ошибок не превышают 10% от величин средних значений. н. а. – не анализировали.

Инкрустирование семян АЛК и Г-АЛК приводит также к повышению энергии прорастания семян. Из табл. 1 видно, что через 4 дня после высева в почву только 36% семян контрольного варианта давали всходы, в случае применения АЛК количество взшедших семян достигало 100% при ее концентрации 0,6 мМ, тогда как при обработке семян Г-АЛК 100%-ное появление всходов наблюдалось уже при 0,012 мМ.

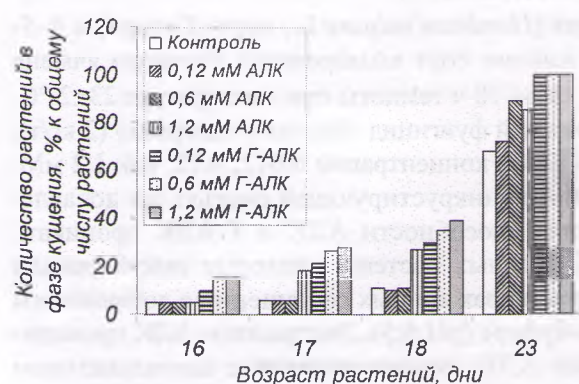


Рис. 1. Влияние АЛК и Г-АЛК на начало фазы кущения у растений ячменя. За 100% в каждом варианте принято общее количество растений. Приведены средние значения из трех экспериментов и их стандартные отклонения

Высота растений ячменя, обработанных на стадии семян растворами АЛК и Г-АЛК, превышала высоту контрольных растений (табл. 1). Максимальная стимуляция роста растений наблюдалась в начальный период их развития на 5–7 день после высадки семян в почву. Высота проростков в варианте с использованием 0,6 мМ АЛК составляла 144% по сравнению с таковой в контроле. Аналогичный эффект достигался в случае применения Г-АЛК в концентрации 0,012–0,12 мМ. С возрастом стимулирующий эффект испытуемых соединений на высоту проростков несколько снижался, составляя в среднем 20% у 10-дневных растений во всех опытных вариантах.



Предпосевная обработка семян АЛК и Г-АЛК приводила к ускорению фазы кушения. Из рис. 1 видно, что на 16-й день развития проростков в вариантах с Г-АЛК количество растений, в которых начался процесс кушения, в 2–3 раза превышало их число в контроле и в вариантах с АЛК. Отчетливый эффект ускорения фазы кушения проявлялся в 17- и 18-дневных опытных растениях, обработанных 1,2 мМ АЛК, а также Г-АЛК во всем диапазоне концентраций, включая минимальную – 0,12 мМ. Инкрустирование семян 0,6 мМ АЛК приводило к повышению показателя общей кустистости на 33% по сравнению с контролем (табл. 1). Такой же рост числа побегов кушения в расчете на одно растение наблюдался в случае применения 0,12 мМ Г-АЛК.

Отмечено увеличение массы надземной части растений на 24% в экспериментах с использованием 0,6 мМ АЛК, тогда как максимальный стимулирующий эффект Г-АЛК на этот показатель составлял 28% и наблюдался при концентрации 0,12 мМ (табл. 1).

Таблица 2. Содержание Хл, каротиноидов и белка в листьях проростков ячменя, обработанных на стадии семян АЛК и Г-АЛК

Параметры	Контроль	АЛК (мМ)			Г-АЛК (мМ)		
		0,12	0,6	1,2	0,12	0,6	1,2
Хл (46-дневные растения), %	100	100	118	157	135	128	143
Каротиноиды (46-дневные растения), %	100	100	108	138	131	128	135
Белок (6-дневные растения), %	100	108	125	135	120	125	132

Примечание. За 100% принято содержание Хл, каротиноидов и белка в листьях контрольных растений, семена которых были инкрустированы фунгицидом «Байтан-универсал» (2 кг/т) и пленкообразователем «Гисинар» (100 г/т). Приведены средние значения из трех экспериментов. Величины стандартных ошибок не превышают 10% от величин средних значений.

Применение АЛК и Г-АЛК приводило к увеличению продуктивной кустистости растений ячменя (рис. 2). Величина эффекта составляла 20% в варианте с 0,12 мМ АЛК. Повышение ее концентрации в инкрустирующей смеси до 0,6 мМ вызывало дальнейший значительный рост количества продуктивных побегов в растениях опытного варианта (до 125% по сравнению с контролем). При использовании Г-АЛК максимальное увеличение числа продуктивных побегов достигалось при концентрации действующего вещества 0,12 мМ.

Анализ содержания фотосинтетических пигментов проводили в листьях 11- и 46-дневных проростков ячменя контрольного и опытных вариантов. В листьях 11-дневных растений незначительное (в среднем на 13%) увеличение количества Хл отмечено в случае применения 1,2 мМ АЛК и всех концентраций Г-АЛК (данные не представлены). Более отчетливая разница в содержании Хл между контрольным и опытными вариантами наблюдалась в растениях 46-дневного возраста (табл. 2). Содержание Хл было выше в среднем на 18 и 57% в растениях, обработанных 0,6 и 1,2 мМ АЛК, и на 35, 28 и 43% при использовании 0,12; 0,6 и 1,2 мМ Г-АЛК по сравнению с контролем соответственно. Обработка семян АЛК и Г-АЛК приводила также к увеличению количества каротиноидов (табл. 2). В экспериментах с АЛК максимальное содержание этих пигментов зарегистрировано в листьях 46-дневных растений при использовании 1,2 мМ АЛК. В случае применения для инкрустирования семян липофильного производного АЛК такое же увеличение количества каротиноидов достигалось при самой низкой концентрации Г-АЛК – 0,12 мМ.

Содержание белка в листьях 6-дневных проростков ячменя, обработанных 0,12; 0,6 мМ и 1,2 мМ АЛК, увеличивалось соответственно на 8, 25 и 35% по сравнению с контролем (табл. 2).

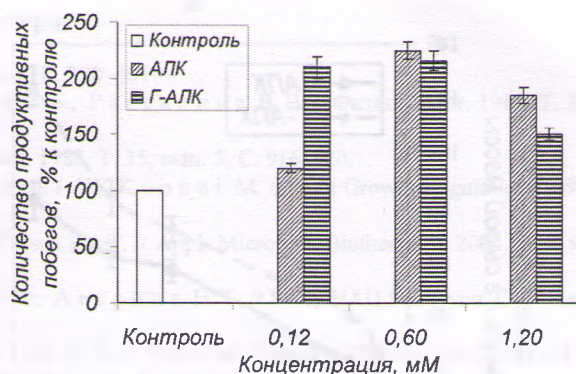


Рис. 2. Влияние АЛК и Г-АЛК на продуктивную кустистость растений ячменя. За 100% принята величина показателя продуктивной кустистости в контрольном варианте. Приведены средние значения из трех экспериментов и их стандартные отклонения



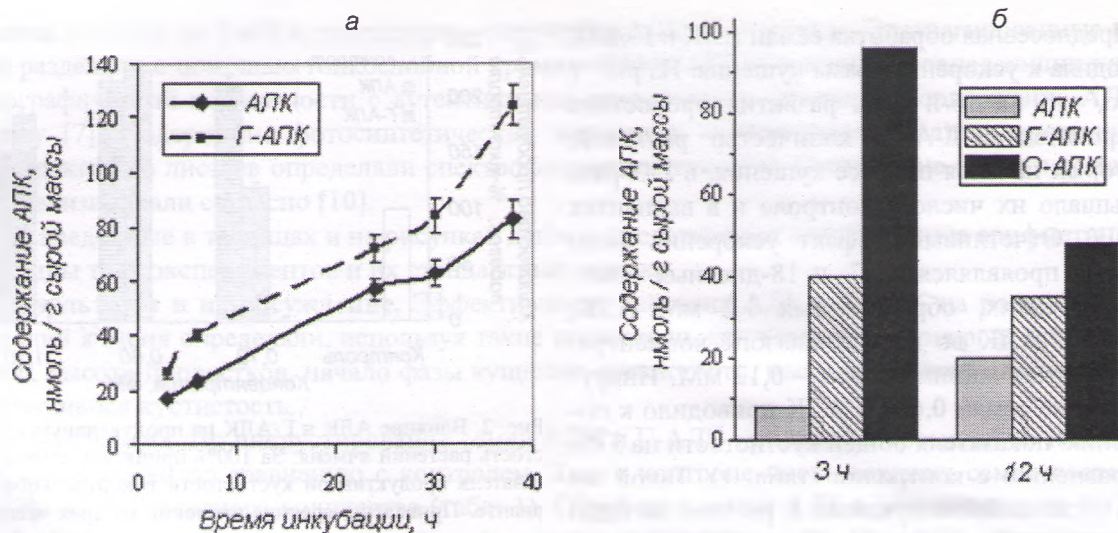


Рис. 3. Содержание АЛК (нмоль/г сырой массы) в листьях ячменя (а) и проростках гороха (б), обработанных экзогенной АЛК, Г-АЛК или О-АЛК. Листья 7-дневных зеленых проростков ячменя инкубировали 38 ч в темноте на 0,6 мМ растворах АЛК и Г-АЛК в присутствии 50 мМ ЛК в 0.1 М Трис-НСl-буфере (рН 6,5). Этилированные проростки гороха инкубировали в течение 3 или 12 ч на 0,3 мМ растворах АЛК, Г-АЛК и О-АЛК. Приведены средние значения из трех экспериментов и их стандартные отклонения

В ходе дальнейшего развития растений разница между этим показателем в опытных и контрольных проростках уменьшалась, однако незначительное превышение содержания белка в варианте с 1,2 мМ АЛК сохранялось. При обработке семян Г-АЛК значительное повышение содержания белка в листьях наблюдалось при более низких, чем в случае АЛК, концентрациях действующего вещества (табл. 2).

Таким образом, сравнительное исследование влияния АЛК и Г-АЛК на растения ячменя показало, что Г-АЛК стимулирует рост и развитие растений, а также повышает в них содержание фотосинтетических пигментов и белка при использовании в значительно более низких концентрациях, чем АЛК.

Мы предположили, что бóльшая эффективность липофильного Г-АЛК в отличие от гидрофильной АЛК обусловлена его повышенной способностью к проникновению в клетки растений за счет неконтролируемой пассивной диффузии. С целью проверки этого предположения было определено количество АЛК в листьях ячменя, инкубированных на растворах АЛК и Г-АЛК в присутствии ЛК, ингибирующей превращение АЛК в порфирины. На протяжении всего времени инкубации более высокое содержание внутриклеточной АЛК обнаруживалось в листьях, обработанных Г-АЛК, чем в варианте с использованием АЛК (рис. 3, а).

Различие в содержании АЛК в растительных тканях, обработанных АЛК и ее липофильными эфирами, практически не зависит от вида растений. Так, при инкубации проростков гороха в 3 мМ растворах АЛК, Г-АЛК, О-АЛК в отсутствие ЛК, АЛК в растительной ткани определяется соответственно в соотношении 1:7:17, что свидетельствует о большей проникающей способности эфиров, зависящей от их гидрофобности и используемой концентрации (рис. 3, б). При исследовании аминокислотных экстрактов из проростков гороха, инкубированных в присутствии эфиров АЛК, установлено, что Г-АЛК и О-АЛК при попадании в клетки растений значительное время остаются в исходном состоянии, что может обуславливать пролонгированный характер их действия на физиологические процессы в растениях.

**Заключение.** В ходе проведенного исследования установлено, что липофилизация молекулы АЛК увеличивает ее способность к проникновению в клетки растений, что позволяет повысить эффективность препаратов на основе АЛК за счет снижения концентрации действующего вещества. Показано, что Г-АЛК стимулирует рост и развитие растений ячменя, а также увеличивает содержание в них фотосинтетических пигментов и белка при использовании в концентрациях в пять раз более низких, чем АЛК.

## Літэратура

1. Rebeiz C. A. // *Enzyme Microb. Technol.* 1984. Vol. 6. P. 390–401.
2. Аверина Н. Г., Шалыго Н. В., Яронская Е. Б., Рассадина В. В. // *Физиол. раст.* 1988. Т. 35, вып. 4. С. 679–686.
3. Аверина Н. Г., Яронская Е. Б. // *Физиол. раст.* 1988. Т. 35, вып. 5. С. 916–920.
4. Hotta Y., Tanaka T., Takeuchi Y., Konnai M. // *Plant Growth Regulation.* 1997. Vol. 22. P. 109–114.
5. Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T., Tanaka T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 58. P. 23–29.
6. Яронская Е. Б., Дрозд Т. В., Шалыго Н. В., Аверина Н. Г. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2006. № 4. С. 77–80.
7. Miller G. W., Denney A., Wood J. K., Welkie G. W. // *Plant Cell Physiol.* 1979. Vol. 20. P. 131–143.
8. Mauzerall D., Granick S. // *J. Biol. Chem.* 1956. Vol. 219. P. 435–446.
9. Vernon L. P. // *Anal. Chem.* 1960. Vol. 32. P. 1144–1150.
10. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

*SPIVAK S. G., YARONSKAYA E. B., VERSHILOVSKAYA I. V., DAVYDOV V. Yu., TROSTYANKO I. V.,  
DOLGOPALETZ V. I., AVERINA N. G., KISEL M. A.*

### STIMULATIVE EFFECT OF LIPHILIC ESTERS OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF BARLEY PLANTS

#### Summary

A comparative study of the growth regulating activity of 5-aminolevulinic acid (ALA) and its lipophilic hexyl ester (H-ALA) was performed. H-ALA was shown to stimulate the growth and development of barley plants as well as to increase the contents of photosynthetic pigments and proteins at much lower concentrations than ALA. The effect observed was determined to be due to facilitated transport of lipophilic derivatives of ALA into the plant cells.