

А. Ф. Лисенков, И. А. Карузина, Л. Р. Нипа

Оптимальные концентрации раствора аммиачной селитры для предпосевной обработки семян лиственницы сибирской

(Сибирский технологический институт)

При подготовке семян древесных растений к посеву часто применяют бионтизацию, предложенную болгарским ученым проф. Поповым в 1923 г. Она заключается в обработке семян растворами удобрений, микроэлементов, ростовых веществ и других биологически активных веществ. Однако бионтизация не всегда дает большой эффект ввиду того, что еще не изучены оптимальные концентрации растворов, применяющихся для предпосевной обработки семян.

Нами проведено определение оптимальных концентраций аммиачной селитры для предпосевной обработки семян лиственницы сибирской. Для экспериментальных работ брали химически чистую аммиачную селитру с содержанием азота равным 35%. Семена лиственницы сибирской заготовки 1963 г. получены из Сонского лесхоза Красноярского края, а заготовки 1965 г. — из Усть-Бирского лесхоза. Сонские семена имели лабораторную всхожесть 81%, а Усть-Бирские — 79%.

Оптимальная концентрация раствора аммиачной селитры определялась следующими способами: 1) по количеству витамина В₁ в прорастающих семенах лиственницы сибирской, 2) по активности амилазы в семенах и проростках, 3) по росту проростков в водных культурах, опилках и почве с добавлением удобрения.

В целях определения влияния аммиачной селитры на активность амилазы и на содержание витамина В₁ в прорастающих семенах брали по 3 г сухих семян лиственницы сибирской и проращивали их в растворах аммиачной селитры раз-

личной концентрации: от 0,5 до 10% (по азоту от 0,17 до 3,5%).

Определение количества витамина B_1 проводилось в 10-процентной водной вытяжке из семян лиственницы сибирской. Вытяжка приготавливалась следующим образом. Три грамма семян лиственницы размалывались на ручной мельнице. Мелкоразмолотые сухие семена заливались 27 мл воды. Размолотые намоченные и набухшие семена заливались 25 мл воды, т. к. они в процессе набухания уже поглотили воду до 50% от своего веса [1]. Водная взвесь отстаивалась в течение 30 мин., а затем отфильтровывалась на складчатом фильтре.

Определение витамина B_1 проводилось по методике Ванга и Харриса [3], несколько измененной нами применительно к работе с растениями. К 5 мл фильтрата водной вытяжки из семян лиственницы сибирской приливали 5 мл изобутилового спирта (изобутанола) предварительно подкислив фильтрат 2 каплями 10-процентного раствора HCl . Это производилось для перевода в осадок веществ, способных флуоресцировать. Затем смесь водной вытяжки со спиртом интенсивно встряхивали. Полученную эмульсию разделяли центрифугированием в течение 30 мин. при 5 тыс. об/мин. Водный слой центрифугата осторожно извлекали и наливали его в две пробирки по 1 мл. В первую пробирку приливали 1 мл 30-процентного раствора едкого натра, во вторую 2—3 капли 2-процентного раствора красной кровяной соли, а затем 1 мл 30-процентного раствора едкого натра. Под действием красной кровяной соли в щелочной среде происходит окисление витамина B_1 в тиохром. Через 1—2 минуты в обе пробирки добавляли по 10 мл изобутилового спирта. Интенсивно встряхивали и ставили в темное место до разделения слоев. Тиохром переходит в спирт. После этого шариковой пипеткой с длинным концом извлекали водную фазу из-под слоя изобутанола. Чтобы отмыть тиохром от щелочи и остатков окислителя, доливали в изобутанол 4 мл дистиллированной воды и встряхивали. После отстаивания вновь извлекали водный слой. Спиртовый слой доливали изобутанолом до 15 мл. Перемешав, отмеривали в пробирку № 2 из нефлуоресцирующего стекла 10 мл полученного раствора тиохрома в изобутиловом спирте и сравнивали флуоресценцию содержимого пробирки № 1, где тиохрома нет, с флуоресценцией содержимого пробирки № 2. В первую пробирку по каплям приливали стандартный раствор тиохрома до тех пор, пока в обеих пробирках флуоресценция не становилась одинаковой.

Стандартный раствор тиохрома приготавливали одно-

временно с окислением витамина B_1 и растворяли его в 100 мл 0,1 м HCl . Отмеривали 1 мл полученного раствора, приливали к нему 2 капли $K_3Fe(CN)_6$ и 1 мл 30-процентного раствора $NaOH$. Через 1—2 минуты приливали 10 мл изобутанола, сильно взбалтывали, давали эмульсии расслоиться в затемненном месте. Извлекали водный слой, промывали 4 мл дистиллированной воды, взбалтывали и т. д. Когда тиохром извлечен изобутиловым спиртом и промыт, объем его раствора доводили изобутанолом до 10 мл. При этом в 1 мл раствора содержалось такое количество тиохрома, которое эквивалентно 1 мг витамина B_1 .

Активность амилазы определялась в сухих и проращиваемых семенах на 1, 3, 5, 7 и 10 день после замачивания их в растворах удобрения. Определение производилось по методике В. Смита и Д. Роя, видоизмененной А. Ф. Лисенковым применительно к работе с растениями [1]. Метод основан на определении способности амилазы расщеплять крахмал. Анализ ведется по цветной реакции крахмала с йодом. Реактивы для определения активности амилазы: 0,075-процентный свежий раствор крахмала, 10-процентная свежеприготовленная водная вытяжка из семян, содержащая амилазу; 0,3-процентный раствор йода в 0,3-процентном растворе йодистого калия. Изменения окрашивания раствора наблюдали с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-М. За единицу активности амилазы принимали количество крахмала (в мг), расщепляемого 10 мл водной вытяжки фермента, то есть 10 г семян в условиях опыта за 1 минуту.

Для определения роста проростков семена проращивали в водопроводной воде в течение двух недель. Затем из них отбирались по 50 шт. проростков. Измерялась их длина, и они укреплялись в картонной крышке над чашками Петри. В чашки Петри наливалась вода или насыпалось по 50 грамм опилок или гумусированной части почвы, смоченной раствором аммиачной селитры различной концентрации: от 0,5 до 2,5% (по азоту от 0,17 до 0,8%). На третий и на пятый день измерялась длина проростков. На пятый день проростки были взвешены и определена их влажность и вес сухого вещества.

Как показали наши исследования, в сухих семенах лиственницы сибирской содержалось 3,52—3,60 мг витамина B_1 в 1 г семян. По мере прорастания семян в дистиллированной воде количество витамина в них увеличивалось (табл. 1).

Таблица 1

Способ проращивания семян	Концентрация раствора NH_4NO_3 , %	Содержание витамина B_1 в $\mu\text{г/г}$ семян через			
		1 сутки	3 суток	5 суток	7 суток
Сухие		3,52			
Проращивание в воде		3,74	3,83	4,07	4,14
Непрерывное проращивание в растворе удобрения	1,0	3,78	3,92	—	4,20
»	2,5	3,83	3,99	—	4,58
»	5,0	4,01	4,25	4,27	3,15
»	7,5	3,55	2,45	—	2,70
»	10,0	2,51	1,46	—	0,83
Намачивание семян 1 сутки в растворе удобрения и проращивание их в воде	1,0	3,78	3,98	—	4,30
»	2,5	3,83	3,93	—	4,73
»	5,0	4,01	4,44	—	4,84
»	7,5	3,55	4,28	—	4,80
»	10,0	2,51	1,89	—	2,70

Применение слабых растворов аммиачной селитры для проращивания семян лиственницы сибирской способствовало образованию большего количества витамина B_1 в них, чем при проращивании семян в дистиллированной воде. Так, при непрерывном проращивании семян лиственницы сибирской в растворах NH_4NO_3 концентрации 1 и 2,5% наибольшее содержание витамина B_1 было через 7 суток, при концентрации 5% — на пятые сутки (табл. 1). Раствор нитрата аммония концентрации 7,5% был безвреден для семян лиственницы в течение только 1 суток, затем он действовал как гербицид (рис. 1), а 10-процентный раствор отравлял семена уже в первые 3 часа. При этом были установлены корреляционные зависимости количества витамина B_1 от времени проращивания семян и от концентрации раствора аммиачной селитры, а также оптимальные концентрации ее раствора.

Таблица 2

Концентрация раствора удобрения, %	Уравнение корреляции количества витамина B_1 и времени предпосевной обработки семян	Срок наблюдения (сутки)
Контроль вода	$y = 0,50 \lg x + 3,01$	10
1,0	$y = 0,52 \lg x + 3,02$	10
2,5	$y = 0,88 \lg x + 2,52$	10
5,0	$y = 1,17 \lg x + 2,07$	5

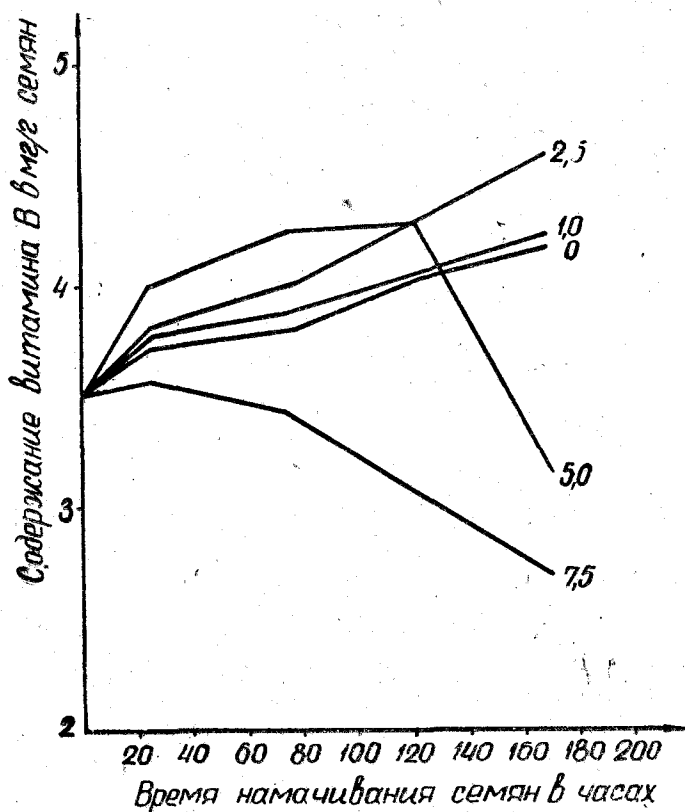


Рис. 1. Влияние азотных удобрений разной концентрации на содержание витамина В₁ в семенах лиственницы.

Корреляционная зависимость содержания витамина В₁ в прорастающих семенах лиственницы сибирской от времени проращивания выражалась уравнениями логарифмических кривых (табл. 2). В этих уравнениях приняты следующие обозначения: y — количество витамина В₁ в мг/г семян, x — время проращивания семян в часах.

Корреляционная зависимость содержания витамина В₁ в прорастающих семенах лиственницы сибирской от концентрации раствора аммиачной селитры выражалась уравнениями параболы второго порядка (табл. 3). В уравнениях приняты следующие обозначения: y — количество витамина В₁ в процентах от количества витамина в сухих семенах, x — концентрация раствора аммиачной селитры в проц.

Таблица 3

Время намачивания семян	Уравнение кор еляции содержания витамина В ₁ и концентрации раствора NH ₄ NO ₃	Корреляционное отношение (η)	Оптимальная концентрация, %	
			по техническому продукту	по азоту
1 сутки	$y = -0,97x^2 + 6,7x + 103$	0,780	3,4	1,19
3 суток	$y = -1,43x^2 + 7,4x + 107$	0,956	2,6	0,91
7 суток	$y = -1,36x^2 + 4,6x + 114$	0,835	1,7	0,38

По уравнениям корреляционной связи содержания витамина В₁ с концентрацией раствора аммиачной селитры (табл. 3) определяли оптимальные концентрации раствора селитры, приравняв производные этих функций (y') к нулю и решая полученные уравнения. Как видно из материалов таблицы 3, в первые сутки наибольшее количество витамина В₁ образуется при проращивании семян в растворе аммиачной селитры концентрации 3,4%. В последующие дни для образования наибольшего количества витамина В₁ требуются более слабые растворы аммиачной селитры. На восьмые сутки наибольшее количество витамина В₁ образовалось при проращивании семян в растворах концентрации 1,7%.

Активность амилазы в прорастающих семенах листовенницы сибирской также изменялась в зависимости от концентрации раствора аммиачной селитры и от времени проращивания семян.

Как видно из материалов графика (рис. 2), активность амилазы в первые часы после намачивания семян повышалась. Особенно длительное время наблюдалось повышение активности амилазы у контрольных семян, проращиваемых в воде. У семян, проращиваемых в растворах удобрений, наблюдалось быстрое повышение активности амилазы в течение первых 3 суток и значительное снижение ее в последующие сутки.

Корреляционная связь активности амилазы в прорастающих семенах с концентрацией раствора аммиачной селитры описывалась уравнениями, показанными в таблице 4. В уравнениях приняты следующие обозначения: y — активность амилазы в процентах от активности амилазы в сухих семенах; x — концентрация раствора удобрения, в %.

В первые 3 часа намачивания семян активность амилазы была оптимальной при концентрации раствора аммиачной селитры 0,9%, а через 24 часа — при концентрации 4,2%. В последующие дни наивысшая активность амилазы была при более слабых растворах азотного удобрения. Так, через семь суток оптимальная концентрация раствора аммиачной

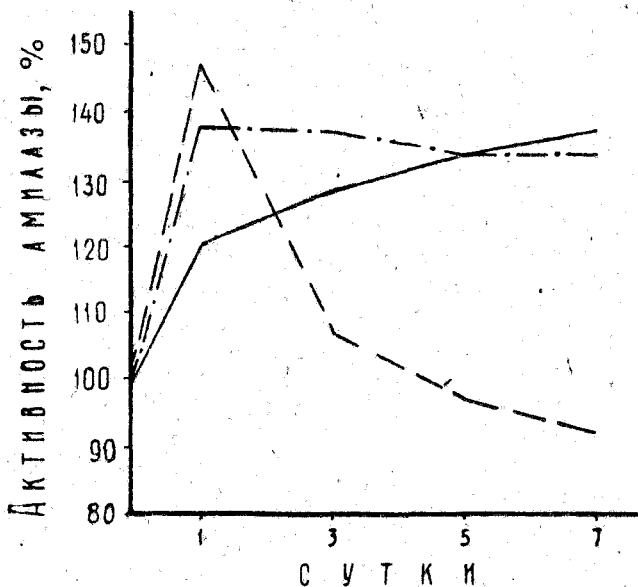


Рис. 2. Активность амилазы в прорастающих семенах лиственницы сибирской:

- вода;
- - - - - раствор аммиачной селитры концентрации 1%;
- - - - - раствор аммиачной селитры концентрации 2,5%.

Таблица 4

Время намачивания семян	Уравнения корреляционной связи активности амилазы и концентрации раствора NH ₄ NO ₃	Оптимальная концентрация раствора NH ₄ NO ₃
3 часа	$y = 3,479 \lg x - 1,732 x + 111,3$	0,87
1 сутки	$y = -0,189 x^3 - 0,504 x^2 + 14,104 x + 121,4$	4,20
3 суток	$y = \frac{0,0073 x^4 - 0,0107 x^3 + 0,464 x^2 - 0,485 x + 1,613}{205}$	0,70
5 суток	$y = \frac{0,0045 x^4 - 0,0738 x^3 + 0,366 x^2 - 0,297 x + 1,540}{205}$	0,45
7 суток	$y = \frac{-0,0057 x^4 + 0,040 x^3 + 0,0977 x^2 - 0,132 x + 1,538}{250}$	0,49
17 суток (земля)	$y = -139 x^2 + 261 x + 102$	0,94
17 суток (опилки)	$y = -331 x^2 + 343 x + 105$	0,52

селитры равнялась 0,5%. Через семнадцать суток при выращивании проростков листовницы в опилках оптимальная концентрация раствора равнялась 0,52%, а при проращивании в гумусном слое почвы — 0,94%.

Выращивание проростков листовницы сибирской в водных культурах с одним только раствором аммиачной селитры не дало положительных результатов. Прирост их был хуже, чем в контроле (табл. 5), они быстро увядали и повреждались грибными болезнями. При проращивании в опилках проростки листовницы были более устойчивы к повреждениям. При использовании в качестве субстрата гумусной части почвы проростки повреждались грибами, но при этом создавались условия, наиболее близкие к произрастанию сеянцев листовницы в питомниках и лесных культурах и проростки отличались наиболее быстрым ростом.

Таблица 5

Субстрат	Прирост проростков по весу при концентрации раствора, %				
	5	0,5	0,75	1,0	1,5
Вода	100	70,0	31,8	13,6	0
Опилки	100	110,0	130,0	53,4	0
Почва	100	110,0	135,0	154,2	83,3

Корреляционная связь между приростом по весу проростков и концентрациями растворов аммиачной селитры выражалась в виде уравнения параболы. Для почвы это уравнение имело вид:

$$y = -44,8x^2 + 39,1x + 102,9,$$

а для опилок:

$$y = -70x^2 + 33x + 111.$$

Оптимальная концентрация раствора аммиачной селитры в первом случае равнялась 0,66, а во втором — 0,23%.

Полученные нами расчетным путем оптимальные концентрации растворов витамина В₁ и аммиачной селитры были проверены в посевах листовницы сибирской в лабораторных условиях и в лесном питомнике. Для определения оптимальной концентрации витамина В₁ сухие семена листовницы сибирской обрабатывались растворами витамина концентрации от 1 до 10 мкг на 1 мл воды. Лучший рост проростков и однолетних сеянцев был при обработке семян растворами, содержащими 4—5 мкг витамина В₁ на 1 мл воды (табл. 6). Так, абсолютно сухой вес 100 штук проростков в возрасте 14 дней, выращенных в воде, равнялся 0,24 г, а в растворах витамина В₁ концентрации 3 мкг/мл воды—0,27 г,

Таблица 6

Концентрация раствора витамина В ₁ на 1 мл воды	Длина проростков, см		Прирост проростков за 10 дней		Абсолютно сухой вес 100 шт. проростков в конце опыта, г
	в начале опыта	через 10 дней	в см	в % от первоначальной длины	
3	1,0 ± 0,04	4,2 ± 0,16	3,2 ± 0,12	310	0,27
4	1,2 ± 0,06	4,6 ± 0,13	3,4 ± 0,10	296	0,30
5	1,1 ± 0,03	4,5 ± 0,12	3,4 ± 0,09	321	0,31
6	1,1 ± 0,04	3,6 ± 0,20	2,5 ± 0,15	220	0,23
7	1,1 ± 0,05	3,3 ± 0,20	2,2 ± 0,14	198	0,21
Вода	1,0 ± 0,05	3,5 ± 0,20	2,5 ± 0,15	264	0,24

концентрации 4 $\mu\text{г}/\text{мл}$ воды — 0,30 г, концентрации 5 $\mu\text{г}/\text{мл}$ воды — 0,631 г и концентрации 6 $\mu\text{г}/\text{мл}$ воды — 0,23 г.

Для определения оптимальной концентрации раствора аммиачной селитры семена лиственницы сибирской обрабатывались растворами селитры концентрации от 1 до 7,5% в течение суток и высевались в лесном питомнике. Наиболее высокая грунтовая всхожесть и лучший рост однолетних семян лиственницы был при непрерывном намачивании семян в растворе аммиачной селитры концентрации 3,5%, а при однодневной обработке семян удобрением и последующим проращиванием их в чистой воде — при концентрации раствора селитры 6,5%.

Выводы

1. Определение оптимальной концентрации азотных удобрений можно производить по активности ферментов (в наших исследованиях — по активности амилазы) и по количеству витамина В₁ в прорастающих семенах, а также методом проростков. В этих целях можно использовать установленные нами эмпирические уравнения корреляционных связей активности амилазы и количества витамина В₁ в семенах и проростках лиственницы сибирской, длины и веса ее проростков с концентрацией раствора аммиачной селитры и сроком предпосевной обработки семян в растворах селитры. По этим уравнениям можно определять оптимальные концентрации растворов аммиачной селитры для предпосевной обработки семян лиственницы сибирской.

2. При кратковременном действии аммиачной селитры на семена (до 1 суток) оптимальными концентрациями ее растворов являются 3—5%. При длительном проращивании

семян лиственницы сибирской в растворах аммиачной селитры оптимальной концентрации является 0,7—1,0%.

3. Для проростков лиственницы сибирской, произрастающих в гумусной части почвы, оптимальной концентрацией раствора аммиачной селитры является 0,66—0,94%, а в опилках — 0,23—0,52%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лисенков А. Ф. Влияние 2,4 Д и гетероауксина на активность аммилазы в семенах и проростках лиственницы сибирской. Сб. материалов конф. по итогам н.-и. работ СТИ за 1963 год. Секция лесохозяйственная. Изд. СТИ, Красноярск, 1964.
2. Лисенков А. Ф., Лисенкова И. А. Влияние аммиачной селитры на содержание витамина В₁ в прорастающих семенах лиственницы сибирской. Тезисы докл. к конференции по итогам н.-и. работ за 1965 год. Изд. СТИ, Красноярск, 1966.
3. Петрунькина А. М. Практическая биохимия. Медгиз, Л., 1961.