

## ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ТБК-РЕАГИРУЮЩИХ ПРОДУКТОВ У ТЕСТ-ОБЪЕКТА *Allium cepa L*

Т.А. Толкачева  
Витебск, УО «ВГУ им. П.М. Машерова»

Окислительный стресс вызывается повышенной генерацией в растительных клетках активных форм кислорода и обусловлен действием УФ-излучения, света высокой интенсивности, низких и высоких температур, катионов тяжелых металлов и ксенобиотиков [1]. Техногенное загрязнение биосферы тяжелыми металлами негативно влияет на состояние растений, которые способны к их аккумуляции и передаче по пищевым цепям к животным и человеку. Тяжелые металлы вызывают окислительный стресс у растений, стимулируя образование в клетках активных форм кислорода. Активные радикалы взаимодействуют с органическими веществами, образуя гидропероксиды ДНК, белков, липидов (РООН). Образование РООН называют перекисным окислением липидов (ПОЛ). Перекисное окисление липидов является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран. Цель данной работы – определение концентрации ТБК-реагирующих продуктов у тест-объекта *Allium cepa L* при стрессе. В качестве модельных стрессовых факторов использовали воздействие сульфата меди и нитрата свинца.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследования использованы луковички севка. Биотестирование различных концентраций сульфата меди и нитрата свинца выполняли с помощью модифицированного *Allium*-теста [2]. Для снижения вредного воздействия солей тяжелых металлов нами предложено использовать водный экстракт куколок дубового шелкопряда (ВЭКШ), полученный в соответствии с авторским свидетельством (Трокоз В.А., Лотош Т.Д., Абрамова А.Б. и др.).

Перед началом эксперимента луковички *Allium cepa* выдерживали при 4°C для активизации и синхронизации процесса прорастания. Предварительно у луковичек удалили внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, а затем поместили в 20-мл пробирки, наполненные дистиллированной водой. Выбор дистиллированной воды обоснован в работе [3]. Проращивание луковичек проводили при комнатной температуре 20-25°C, при естественном освещении. Через 48 часов отбрали в каждую группу по 15 стандартизованных луковичек, и поместили их на 24 часа в тестируемые растворы. В качестве контроля использовали дистиллированную воду (К). Воду и растворы для обеспечения аэрации меняли каждые 24 часа в течение пяти первых суток, в последующие дни ежедневно доливали в пробирки дистиллированную воду.

Для количественного определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в зелени лука использовали тест с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для этого 0,5г листьев лука измельчали, помещали в фарфоровую ступку, заливали 4 мл 0,25% ТБК в 10% растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и растирали до гомогената, который переносили в центрифужные пробирки. Уровень маркировали. Пробы инкубировали в течение 30 мин в кипящей водяной бане, после чего охлаждали в проточной воде, доводили до метки дистиллированной водой и центрифугировали 15 мин при 8000g. Супернатант спектрофотометрировали при 532 и 600 нм. Концентрацию ТБК-реагирующих продуктов рассчитывают с учетом коэффициента экстинкции  $155 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [4].

**Результаты и их обсуждение.** Результаты по влиянию сульфата меди и нитрата свинца на концентрацию ТБК-позитивных веществ приведены в таблице.

Таблица – Концентрация ТБК-реагирующих продуктов в листьях лука при воздействии солей тяжелых металлов

№ опыт-ной группы	ВЭКШ, мл/100мл H <sub>2</sub> O	ВЭКШ, мл/100мл р-ра соли	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, мг/л	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , мг/л	A, мкМ/г сыр.веса
1			2,5		3,73±0,029 <sup>1</sup>
2		10	2,5		2,42±0,012 <sup>2</sup>
3				331	2,58±0,029 <sup>1</sup>
4		10		331	1,78±0,009 <sup>1,2</sup>
5				3,31	2,23±0,032 <sup>1</sup>
6				3,31	1,69±0,020 <sup>1,2</sup>
7	10				3,86±0,015 <sup>1</sup>
8	1				2,25±0,015 <sup>1</sup>
9	0,1				2,41±0,023
10	0,01				2,51±0,020
11	0,0001				1,56±0,009 <sup>1</sup>
контроль					2,44±0,023

Примечание: <sup>1</sup> - p<0,05 по сравнению с контролем;

<sup>2</sup> - p<0,05 по сравнению с группой без экстракта.

Из таблицы видно, что высокая концентрация водного экстракта куколок шелкопряда (10мл/100мл H<sub>2</sub>O) оказывает стимулирующее воздействие на перекисное окисление липидов, которое регистрируется достоверным повышением концентрации ТБК-позитивных веществ (малоновый диальдегид). В интервале концентраций от 1 до 0,001мл/100мл H<sub>2</sub>O не обнаружено влияния экстракта на концентрацию ТБК-реагирующих продуктов (концентрация не отличается от контроля). При самом малом разведении ВЭКШ (0,0001мл/100мл H<sub>2</sub>O) обнаружен выраженный антиоксидантный эффект, заключающийся в достоверном снижении образования малонового диальдегида. Добавление CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O в дозе 2,5мг/л достоверно активировало образование ТБК-позитивных веществ, а параллельное добавление ВЭКШ в количестве 10мл/100мл раствора соли устраняло эффект ионов меди. Свинец в концентрации 331мг/л и 3,31мг/л не вызвали существенного повышения продуктов перекисного окисления липидов, но при добавлении экстракта куколок шелкопряда вызвало достоверное снижение образования ТБК-позитивных веществ.

**Заключение.** Таким образом, водный экстракт куколок шелкопряда в количестве 10мл/100мл H<sub>2</sub>O обладает прооксидантным эффектом, но при действии химических индукторов окислительного стресса прооксидантное действие экстракта трансформируется в антиоксидантное действие. По всей видимости, это связано со сложной структурой антиоксидантного комплекса гемолимфы, способного участвовать в прооксидантных и антиоксидантных эффектах (связанных с периодом диапаузы насекомого), что может использоваться в качестве биорегуляции свободнорадикальных процессов.

#### Список литературы

1. Перекисное окисление липидов и проницаемость клеточных мембран в листьях ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированным бенгальским розовым /Н.В. Козел, Н.В. Шальго // Вести НАН Беларуси. – 2008.- С.63-66.
2. Тарчевский И. А. Катаболизм и стресс растений. – М.: Наука, 1993. – 83с.
3. Fiskesjo, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring / G. Fiskesjo // Hereditas .- 1985.- V. 102.- P. 99-102.
4. De Vos C.H.R., Shat H., Vooijs R. etal. // J. Plant Physiol. 1989. Vol. 135. P. 154-169.