

# Влияние оксидата торфа и экстракта куколок дубового шелкопряда на некоторые морфометрические и биохимические показатели *Allium cepa* L. и *Hordeum vulgare* L.

**Т.А. Толкачева, И.Н. Хохлова**

*Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»*

*Статья посвящена изучению морфометрических и биохимических параметров двух тест-объектов (*Allium cepa* L. и *Hordeum vulgare* L.) при однократной 24-часовой обработке водным экстрактом куколок дубового шелкопряда и оксидатом торфа. Растения выращивали в лабораторных условиях в течение 7 суток (ячмень) и 12 суток (лук). Выявлено, что при действии экстракта куколок шелкопряда и оксидата торфа в разведениях 1:10000 на лук и ячмень значимо увеличиваются показатели, отвечающие за продуктивность растений (количество фенолов, хлорофиллов,  $\alpha$ -аминного азота). При этом уменьшается или остается на уровне контроля количество продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов). Биостимулирующие эффекты водного экстракта куколок дубового шелкопряда более выражены по сравнению с эффектами оксидата торфа.*

**Ключевые слова:** биотестирование, *Allium*-тест, тест-объект, *Hordeum vulgare*, оксидат торфа, водный экстракт куколок дубового шелкопряда.

## Effect of oxidative peat and oak silkworm pupae extract on some morphometric and biochemical parameters of *Allium cepa* L. and *Hordeum vulgare* L.

**T.A. Tolkacheva, I.N. Khokhlova**

*Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»*

*The paper studies the forms and biochemical parameters of the two test objects (*Allium cepa* L. and *Hordeum vulgare* L.) with a single 24-hour treatment with aqueous extract of oak silkworm pupae and oxidative peat. Plants were grown in vitro for 7 days (barley) and 12 days (onion). It is found out that under the influence of the extract of silkworm pupae and oxidative peat dilution of 1:10000 on onions and barley parameters, responsible for plant productivity (the amount of phenols, chlorophyll,  $\alpha$ -amino nitrogen) significantly increase. The amount of lipid peroxidation products (malondialdehyde and diene conjugates) decreases or remains at the level of control. Biostimulating effects of aqueous extract of oak silkworm pupae are more pronounced than the effects of oxidative peat.*

**Key words:** biotesting, *Allium*-test, test-object, *Hordeum vulgare*, oxidative peat, aqueous extract of oak silkworm pupae.

В последние годы в сельском хозяйстве в связи с постоянно изменяющимися условиями среды для защиты растений от действия неблагоприятных факторов все чаще применяются регуляторы роста. Наибольшую эффективность представляют собой регуляторы на основе биологически активных веществ (БАВ), которые влияют на растения путем стимуляции иммунной системы и оптимизации биохимических процессов. Научной основой практического применения БАВ в сельском хозяйстве является изучение внутренних механизмов их действия для управления качеством получаемого урожая. В настоящее время предпочтение получают препараты, обладающие антиоксидантной и антимуtagenной активностью, созданные на основе биоматериала. Уже вышли на стадию внедрения и применения препараты третьего поколения, гектарные дозы применения которых исчисляются миллиграммами [1].

Растительные организмы в природных условиях нашего региона часто подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, связанных с низкими зимними и высокими летними температурами. В результате развиваются острые специфические и хронические неспе-

цифические реакции, ведущие к поражению жизненно важных функций организма. При этом происходит торможение фотосинтеза, усиление дыхания, повышение содержания свободных радикалов, а также повышение проницаемости мембран, активация синтеза стрессовых белков [2]. Длительное влияние стрессовых факторов ведет к изменениям метаболизма, поэтому урожайность сельскохозяйственных культур во многом определяется их устойчивостью к этим факторам. Для предупреждения развития патологических изменений используют различные антиоксидантные препараты, способствующие торможению или блокировке процессов свободнорадикального окисления и увеличению в организме уровня веществ с антиокислительным действием. Значительный интерес вызывают препараты на основе природного сырья с целью получения экологически чистой продукции, биосовместимые с растениями. Их получают путем гидролиза, нейтрализации и сушки, чаще всего гидробионтов. Однако в природе имеется уникальный объект, содержащий мощную антиоксидантную систему, полученную в результате запрограммированного гистолиза *in vivo*, – куколка дубового шелкопряда. В этом периоде жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистолиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к окислительному стрессу и бактериальной контаминации. Природный гидролизат содержимого куколок служит сырьем для создания лечебно-профилактических продуктов, обладающих антиоксидантным, иммуномодулирующим и регулирующим метаболизм действиями [3]. Нами получена комбинация гидрофильных субстанций из куколок дубового шелкопряда, включающая витамины, аминокислоты и низкомолекулярные биорегуляторы, – водный экстракт куколок дубового шелкопряда (ВЭКШ) [4].

Действие ВЭКШ на растения сравнивали с действием биологического препарата оксидата торфа (ОТ), который находит широкое применение в сельском хозяйстве Республики Беларусь. Препарат представляет собой 4% водный концентрат биологически активных веществ, содержащихся в природном продукте – торфе, полученный путем специально разработанной технологии с удалением балластных веществ. В ОТ содержится до 98,1% гуминовых кислот и широкий спектр аминокислот, которые обладают повышенным биостимулирующим действием на рост и развитие растений, им свойственна высокая миграционная подвижность в почве.

Для биотестирования ОТ и ВЭКШ использовали лук репчатый (*Allium cepa* L.) и ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.). Лук применяется в методиках биотестирования благодаря высокой чувствительности, устойчивой реакции как на молекулярно-клеточном, так и организменном (ингибирование роста корней) уровнях, простоте и оперативности методик, достоверной связи результатов с выводами, полученными на прокариотах и других эукариотах [5]. Ячмень обыкновенный используется в качестве тест-объекта для генетических и биохимических исследований благодаря биохимическим, физиологическим и морфологическим микроскопическим изменениям на молекулярном, субклеточном, клеточном уровнях и макроскопическим изменениям на организменном уровне [6].

Адаптация растений к действию различных регуляторов роста связана с многообразными изменениями ряда физиологических процессов – дыхания, фотосинтеза, обмена белков, нуклеиновых кислот, поэтому целью работы явилось выявление действия биологически активных композиций на растительные объекты.

**Материал и методы.** Для биотестирования ОТ и ВЭКШ применяли лук-севок (сорт Штуттгартен Ризен) и зерновки ячменя (сорт Гонар). Проращивание луковиц проводили в пробирках при комнатной температуре и естественном освещении. В растворы ОТ и ВЭКШ луковицы помещали на 24 часа на 3-и сутки. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Для учета морфометрических параметров и биохимических анализов использовали растения на 12-е сутки.

Семена ячменя помещали на 24 часа в растворы тестируемых регуляторов роста. Контрольную группу семян – в дистиллированную воду. Набухшие зерновки раскладывали на фильтровальную бумагу, сворачивали в рулоны, помещали в стаканы с дистиллированной водой. Проращивали в термостате при температуре 23°C. Для учета морфометрических параметров и биохимических анализов использовали растения на 7-е сутки.

ВЭКШ готовили в соответствии с патентом и стандартизировали по содержанию основной действующей субстанции – сумме свободных аминокислот [4]. В опытах использовали отечественный оксидат торфа (ЗАО «Юнатэкс»). БАВ разводили водой 1:10000, т.к. ранее было показано стимулирующее действие малых доз ВЭКШ [7].

Для определения показателя «длина корешков» рассчитывали среднюю длину корней для каждой луковицы в опытных и контрольных сериях экспериментов. Затем вычисляли общее среднее

значение длины для опытной серии и контрольной. Экстракцию фотосинтетических пигментов проводили безводным ацетоном. Количество хлорофиллов и каротиноидов исследовалось спектрофотометрически при 440, 644, 662 и 700 нм [8]. Содержание  $\alpha$ -аминного азота определяли нингидриновым методом [9], а количество суммы фенольных соединений в спиртовых экстрактах – спектрофотометрическим методом [10]. Определение конъюгированных диенов проводили с использованием смеси гептана с изопропиловым спиртом (1:1) [11]. Для количественного изучения продуктов перекисного окисления липидов в зелени растений использовали тест с 2-тиобарбитуровой кислотой [12]. Для определения активности каталазы использовали модифицированный метод, основанный на исследовании количества  $H_2O_2$ , не разложившегося после инкубации его с каталазой, путем спектрофотометрической регистрации окрашенного продукта реакции взаимодействия пероксида водорода с молибдатом аммония. Активность каталазы рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции –  $22200 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$  [13].

Полученный цифровой материал после проверки на правильность распределения вариационных рядов обрабатывали статистически с помощью критерия t Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты экспериментальной работы приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

**Влияние ОТ и ВЭКШ на некоторые показатели *Allium cepa* L.**

Показатель	Длина корешков, мм	Сумма фенолов, %	$\Sigma$ хлорофиллов а+b, мг/л	$\alpha$ -аминный азот, мкг/г ткани	ДК, мкМоль/г ткани	МДА, мкМоль/г ткани
Контроль	18,2±1,57	16,4±1,96	7,3±0,10	8,6±0,14	0,4±0,02	3,1±0,44
ВЭКШ	27,6±6,90 <sup>1</sup>	34,3±8,83 <sup>1</sup>	15,8±0,63 <sup>1</sup>	10,3±0,57 <sup>1</sup>	0,3±0,03 <sup>1</sup>	3,1±0,40
ОТ	18,9±3,99	25,8±4,21 <sup>1</sup>	7,8±0,4	9,7±0,87 <sup>1</sup>	0,4±0,02	3,5±0,22

**Примечание:** <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Как следует из результатов, приведенных в табл. 1, ОТ не оказал значимого влияния на рост корневой системы лука, в отличие от ВЭКШ, при действии которого достоверно увеличивалась длина корешков на 51,6% по сравнению с контролем. Выявлено положительное влияние биостимуляторов на количество фенольных соединений. Суммарное накопление общих фенолов увеличилось на 109,1% (при действии ВЭКШ) и на 57,3% (при действии ОТ), что положительно сказывалось на росте лука, т.к. фенольные соединения выступают в качестве запасных веществ в обмене веществ растений. Содержание  $\alpha$ -аминного азота достоверно увеличилось на 19,8% (при тестировании экстракта куколок) и на 12,8% (при тестировании оксидата торфа), что может свидетельствовать об увеличении количества свободных аминокислот, которые используются для биосинтеза белков. Обработка ВЭКШ приводит к увеличению суммы хлорофиллов на 35,0%, соответственно увеличивается и продуктивность опытных растений. Нами было установлено уменьшение (на 25,0%) содержания диеновых конъюгатов (ДК), которые являются первичными продуктами, образующимися при окислении мембранных липидов. На содержание малонового диальдегида (МДА), который является одним из конечных продуктов процесса перекисного окисления липидов, действие ВЭКШ и ОТ статистически значимого влияния не оказало, следовательно, их влияние не является стрессовым воздействием для лука.

Для подтверждения более эффективного влияния ВЭКШ, по сравнению с ОТ, на рост и развитие растений были изучены некоторые параметры на культуре злаковых растений. В качестве тест-объекта использовали ячмень обыкновенный. Эффект действия биорегуляторов роста на морфометрические и биохимические показатели оказался сходным с ранее полученными результатами на луке.

Влияние ОТ и ВЭКШ на некоторые показатели *Hordeum vulgare* L.

Показатель	Длина корешков, мм	$\alpha$ -аминный азот, мкг/г ткани	МДА, мкМоль/г ткани	Активность каталазы, ммоль/мин
Контроль	123,9 $\pm$ 2,09	13,9 $\pm$ 0,40	2,6 $\pm$ 0,14	9,7 $\pm$ 0,44
ВЭКШ	151,9 $\pm$ 2,11 <sup>1</sup>	23,4 $\pm$ 2,43 <sup>1</sup>	1,7 $\pm$ 0,07 <sup>1</sup>	3,6 $\pm$ 0,18 <sup>1</sup>
ОТ	146,4 $\pm$ 3,22 <sup>1</sup>	14,1 $\pm$ 0,97	2,0 $\pm$ 0,11	4,7 $\pm$ 0,11 <sup>1</sup>

Примечание: <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Проведенные исследования показали, что применение биологических препаратов привело к статистически значимому увеличению средней длины корней ячменя на 22,6% (ВЭКШ) и 18,2% (ОТ), что свидетельствует о проявлении ими биостимулирующих свойств. Как следует из результатов, представленных в табл. 2, содержание  $\alpha$ -аминного азота достоверно увеличивалось на 68,4% при обработке семян экстрактом шелкопряда, т.к. в его составе содержится широкий спектр свободных аминокислот. Содержание ТБК-позитивных (МДА) веществ по отношению к контролю значимо уменьшалось на 34,6% при действии гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда. Активность каталазы, отвечающей за расщепление перекиси водорода, до которой дисмутирует супероксидный радикал, на молекулы воды и кислорода, статистически значимо снижалась на 62,9% (ВЭКШ) и 51,5% (ОТ).

**Заклучение.** Показано, что при действии экстракта куколок шелкопряда и оксидата торфа в разведениях 1:10000 на лук и ячмень статистически значимо увеличиваются показатели, отвечающие за продуктивность растений. При этом уменьшается или остается на уровне контроля количество продуктов перекисного окисления липидов. Биостимулирующие эффекты водного экстракта куколок дубового шелкопряда более выражены по сравнению с эффектами оксидата торфа. Жидкое содержимое куколок дубового шелкопряда можно использовать как сырье для получения антиоксидантных и биостимулирующих препаратов для растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шелото, Б.В. Эффективность применения препаратов diaзотрофных, фосфатмобилизующих микроорганизмов и регуляторов роста при создании культурных лугов / Б.В. Шелото. – Горки: БГСА, 2005. – 141 с.
2. Войников, В.К. Физиологический стресс и регуляция активности генома клеток эукариотов / В.К. Войников, Г.Г. Иванова // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 105, № 1. – С. 3–14.
3. Биологическая активность продуктов гистолита / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Т.А. Толкачева. – Germany: Lambert Academic Publishing, 2012. – 156 с.
4. Способ получения средства для профилактики инсулинорезистентности / А.А. Чиркин [и др.] // Патент Республики Беларусь № 15645. Зарегистрировано 26.12.2011.
5. Fiskesjö, G. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring / G. Fiskesjö // Hereditas. – 1985. – Vol. 102. – P. 99–102.
6. Туровцев, В.Д. Биоиндикация / В.Д. Туровцев, В.С. Краснов. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2004. – 260 с.
7. Толкачева, Т.А. Действие гидрофильных компонентов куколок шелкопряда на тест-объект *Allium cepa* L. / Т.А. Толкачева // Наука – образованию, производству, экономике: материалы XV (62) Рег. науч.-практ. конф. преподавателей, научных сотрудников и аспирантов, посвящ. 100-летию со дня основания УО «ВГУ имени П.М. Машерова», Витебск, 3–5 марта 2010 г. / Вит. гос. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2010. – С. 122–123.
8. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154–170.
9. Узбеков, Г.А. Определение аминного азота в белках и аминокислотах калориметрическим нингидриным методом / Г.А. Узбеков // Вопросы медицинской химии. – 1958. – Т. 4. – С. 69.
10. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова. – М.: Высш. школа, 1983. – 176 с.
11. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.
12. Dipierro, S. The Ascorbate System and Lipid Peroxidation in Stored Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers / S. Dipierro, S.D. Leonardis // J. Exp. Bot. – 1997. – Vol. 48. – P. 779–783.
13. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

Поступила в редакцию 15.01.2013. Принята в печать 20.02.2013

Адрес для корреспонденции: e-mail: tanyatolkacheva@mail.ru – Толкачева Т.А.