

УДК 581.19

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО *ALLIUM*-ТЕСТА

Т.А. ТОЛКАЧЕВА

*Витебский государственный университет имени П.М. Машерова
210038 Витебск, Московский просп., 33
e-mail: tanyatolкачева@mail.ru*

Изучали морфометрические и биохимические параметры тест-объекта (*Allium cepa* L.) при однократной 24-часовой обработке солями тяжелых металлов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) и водным экстрактом куколок дубового шелкопряда. В листьях обработанных растворами солей меди и свинца луковиц обнаружено повышенное содержание ТБК-активных веществ и пониженное содержание фотосинтетических пигментов. Обработка луковиц растворами солей меди и свинца во всем исследованном диапазоне концентраций приводила к угнетению роста корней, снижению содержания α -аминного азота и повышению содержания фенольных соединений. При добавлении гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда к растворам солей меди и свинца токсический эффект последних уменьшался, а исследуемые показатели во многих случаях достигали диапазона контрольных значений. Результаты выполненных работ могут служить обоснованием для изучения протекторного действия водного экстракта куколок дубового шелкопряда на растительных объектах.

Ключевые слова: *Allium cepa* L., биотестирование, тяжелые металлы, биологически активные композиции, *Allium*-тест, водный экстракт куколок дубового шелкопряда.

К настоящему времени хорошо изучен фитотоксический эффект тяжелых металлов (ТМ) [1, 12]. Известно, что свинец и медь широко представлены в различных экосистемах. Свинец не выполняет важные функции в метаболизме растений, однако негативно влияет на прорастание семян, удлинение корней и побегов, ингибирует синтез хлорофилла и ферментов, индуцирует развитие хлороза, вызывает повреждение клеточных структур, нарушает прохождение митоза, цитокинеза и т.д. [16]. Медь, напротив, является микроэлементом, необходимым для жизнедеятельности организмов. В растениях она участвует в переносе электронов в митохондриальных дыхательных цепях, фотосинтезе, транспорте железа, фиксации азота, защите от оксидантного стресса, процессах роста и развития [10]. Однако даже при незначительном избыточном накоплении ионы меди могут оказывать отрицательный эффект из-за образования избыточного количества гидроксильных радикалов, которые нарушают нативную структуру белков, нуклеиновых кислот, других макромолекул. В результате структурно-функциональных изменений происходят задержка роста, ускоренное старение [13, 15]. Считается, что соли тяжелых металлов способны инициировать реакции окислительного

стресса в растительных объектах, сопровождающиеся альтерацией клеточных структур, нарушением механизмов передачи сигналов [11].

В связи с широким распространением в биосфере ТМ актуален поиск средств, ослабляющих их негативное влияние на рост культурных растений. Для скрининговых исследований токсикантов и средств, предупреждающих или ослабляющих их действие, применяют *Allium*-тест [14]. Среди источников биологически активных веществ антиоксидантного действия, используемых в растениеводстве, до настоящего времени не исследованы препараты из куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). Ранее были описаны бактериостатические и антиоксидантные эффекты водного экстракта куколок шелкопряда (ВЭКШ). В составе ВЭКШ содержатся антиоксидантные аминокислоты, антиоксидантные витамины, мочевиная кислота, соединения, содержащие SH-группы [3, 6]. Мы решили выяснить возможность использования гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда, содержащих по условиям получения пептиды и аминокислоты, для снижения проявлений окислительного стресса у растений.

Целью работы было изучение действия низкомолекулярных гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на биохимические показатели листьев луковиц (*Allium cepa* L.), обработанных растворами солей свинца и меди.

Методика

Объектом исследования были луковицы лука сорта Штуттгартен ризен диаметром 2,0 см. Луковицы выдерживали в течение 14 сут при 4 °С для синхронизации процесса прорастания. Затем у них удаляли внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, помещали в пробирки на 20 мл, наполненные дистиллированной водой, и проращивали в течение 48 ч при комнатной температуре и естественном освещении. Формировали 14 групп по 15 луковиц в каждой. Первые 6 групп луковиц на протяжении 24 ч обрабатывали растворами солей CuSO_4 (12,5; 2,5 и 1,25 мг/л) и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (331; 33,1 и 3,3 мг/л); вторые 6 групп луковиц — аналогичными растворами солей, содержащими по 55 мг/л стандартизированного по сумме свободных аминокислот препарата ВЭКШ. Луковицы контрольных групп содержались в дистиллированной воде и водном экстракте куколок дубового шелкопряда.

Препарат ВЭКШ получали трехкратной экстракцией измельченных куколок 0,86 %-м раствором NaCl при 100 °С с последующей стандартизацией по сумме аминокислот [8]. В последующие 9 сут все группы луковиц росли на дистиллированной воде. Модификация *Allium*-теста заключалась в использовании для биохимических исследований зеленых листьев. В гомогенатах листьев лука определяли содержание продуктов пероксидного окисления липидов с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные вещества) [9].

Для определения диеновых конъюгатов (ДК) получали суспензию хлоропластов: 0,5 г листьев растирали с 3,5 мл среды выделения (содержащей 0,1 М *трис*-HCl и 1 М NaCl) на льду, центрифугировали в течение 6 мин при 4 тыс. об/мин при охлаждении (4 °С). Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали с 1,5 мл 0,035 М NaCl. Для определения ДК 0,5 мл суспензии растворяли в 4,5 мл смеси гептан : изопропиловый спирт в соотношении 1 : 1 и центрифугировали 10 мин при 4 тыс.

об/мин. Для разделения фаз к надосадочной жидкости добавляли 0,25 мл воды. К 0,5 мл верхней гептановой фазы приливали 2,5 мл этанола и спектрофотометрировали при 232 нм. Раствором сравнения служил этанол.

Содержание ДК определяли с учетом коэффициента молярной экстинкции — $2,2 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [4]. Количество хлорофиллов и каротиноидов определяли спектрофотометрически в ацетоновых вытяжках по методу Шлыка [7], содержание фенольных соединений — в спиртовых экстрактах (0,5 г листьев в 50 мл 70 %-го этанола — кипячение на водяной бане в течение 30 мин). К 0,2 мл полученного спиртового экстракта прибавляли 7,7 мл H_2O , 0,1 мл реактива Фолина—Чокальте, 2 мл 10 %-го раствора карбоната натрия, все тщательно перемешивали и выдерживали 15 мин в темном месте. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 720 нм, раствором сравнения была H_2O . Содержание суммы фенольных соединений определяли в процентах в перерасчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье [2], α -аминного азота — нингидриновым методом [5]. У всех растений оценивали длину корней и листьев. Полученный цифровой материал после проверки на правильность распределения вариационных рядов обрабатывали статистически с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Известно, что соли тяжелых металлов способны инициировать свободнорадикальные процессы в растительных и других биологических объектах. В табл. 1 представлены данные о содержании ТБК-активных ве-

ТАБЛИЦА 1. Действие растворов солей тяжелых металлов и водного экстракта куколок шелкопряда на содержание ТБК-активных веществ (ТБКАВ) и пигментов в листьях лука

Номер варианта	Обработка луковиц		Исследуемый параметр		
	CuSO_4 , мг/л	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, мг/л	ТБКАВ, мкмоль/г	Сумма хлорофиллов, мг/г	Каротиноиды, мг/г
1	12,5+ВЭКШ		$2,4 \pm 0,02^{1,2}$	$0,35 \pm 0,01^{1,2}$	$0,019 \pm 0,002^{1,2}$
2	12,5		$3,11 \pm 0,02^{1,3}$	$0,09 \pm 0,01^{1,3}$	$0,005 \pm 0,001^{1,3}$
3	2,5+ВЭКШ		$2,2 \pm 0,01^{1,2,3}$	$0,25 \pm 0,03$	$0,022 \pm 0,004^{2,3}$
4	2,5		$3,7 \pm 0,03^{1,3}$	$0,18 \pm 0,04^{1,3}$	$0,09 \pm 0,002^{1,3}$
5	1,25+ВЭКШ		$2,4 \pm 0,01^{1,2}$	$0,26 \pm 0,02^3$	$0,021 \pm 0,02^{1,2}$
6	1,25		$3,22 \pm 0,03^{1,3}$	$0,23 \pm 0,01^{1,3}$	$0,011 \pm 0,001^{1,3}$
7		331+ВЭКШ	$2,49 \pm 0,01^{1,2}$	$0,34 \pm 0,02^{1,2}$	$0,015 \pm 0,001^1$
8		331	$2,58 \pm 0,03^{1,3}$	$0,19 \pm 0,01^{1,3}$	$0,016 \pm 0,001^1$
9		33,1+ВЭКШ	$1,77 \pm 0,01^{2,3}$	$0,36 \pm 0,02^{1,2}$	$0,020 \pm 0,001^{1,2}$
10		33,1	$3,12 \pm 0,02^{1,3}$	$0,21 \pm 0,01^{1,3}$	$0,013 \pm 0,001^{1,3}$
11		3,31+ВЭКШ	$2,11 \pm 0,03^{1,2,3}$	$0,46 \pm 0,02^{1,2,3}$	$0,039 \pm 0,010^{1,2,3}$
12		3,31	$2,23 \pm 0,03^{1,3}$	$0,20 \pm 0,02^3$	$0,016 \pm 0,001^1$
13	H_2O (контроль 1)		$1,68 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,02^3$	$0,027 \pm 0,002^3$
14	ВЭКШ (контроль 2)		$1,66 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,01^1$	$0,019 \pm 0,002^1$

Примечание. Здесь и в табл. 2: $^1p < 0,05$ по сравнению с контролем; $^2p < 0,05$ по сравнению с группой без ВЭКШ; $^3p < 0,05$ по сравнению с ВЭКШ.

ществ как характеристике выраженности свободнорадикальных процессов, уровнях хлорофиллов и каротиноидов, являющихся участниками фотосинтеза в растительных клетках.

Из анализа данных табл. 1 следует, что на 9-е сутки проращивания обработанных растворами солей меди и свинца луковиц в листьях растений обнаружено повышенное содержание ТБК-активных веществ. Закономерной зависимости степени накопления ТБК-активных веществ от концентрации солей меди и свинца в растворах для обработки луковиц не найдено. Таким образом, на 9-е сутки проращивания можно лишь констатировать факт действия стрессоров в прошлом, но нельзя оценить их количественные характеристики. Поскольку содержание ТБК-активных веществ превышало уровень контроля 1 в листьях, появившихся после обработки луковиц растворами солей меди и свинца, можно предположить, что такая обработка луковиц инициирует долгосрочные реакции по механизмам окислительного стресса. Это подтверждается существенным снижением содержания суммы хлорофиллов в листьях предварительно обработанных растворами солей меди и свинца луковиц. Аналогичного снижения содержания каротиноидов в листьях на 9-е сутки после обработки луковиц растворами солей меди и свинца выявить не удалось, вероятно потому, что период полужизни этих соединений намного короче, чем хлорофиллов.

В варианте, где применяли экстракт куколок шелкопряда (контроль 2), количество ТБК-активных веществ было близко к контролю 1 (H_2O), а сумма хлорофиллов и количество каротиноидов — достоверно выше. Во всех вариантах опыта (1, 3, 5, 7, 9, 11), в которых к растворам солей меди и свинца добавляли препарат ВЭКШ, на 9-е сутки в листьях растений содержание ТБК-активных веществ не отличалось от уровня контроля 1. В большинстве вариантов опыта в листьях луковиц, предварительно обработанных растворами солей тяжелых металлов совместно с препаратом ВЭКШ, содержание суммы хлорофиллов и каротиноидов соответствовало уровню контроля 1.

Полученные результаты можно объяснить двумя причинами: 1) в процессе обработки луковиц растворами солей тяжелых металлов препарат ВЭКШ связал их и тем самым предотвратил действие химических стрессоров; 2) препарат ВЭКШ оказал защитный эффект за счет низкомолекулярных биорегуляторов, содержащихся в продуктах гистолиза куколок дубового шелкопряда [6]. Связывание солей тяжелых металлов в модельных опытах *in vitro* не обнаружено. Кроме того, эффект накопления ТБК-активных веществ был однотипным в широком диапазоне концентраций солей в использованных растворах: по $CuSO_4$ — 12,5—1,25, по $Pb(NO_3)_2$ — 331—3,31 мг/л. Поэтому более вероятной является вторая причина.

В результате проведенных исследований также выявлено, что однократное действие на луковицу экстракта куколок дубового шелкопряда (контроль 2) способствовало статистически значимому удлинению корней и повышению концентрации фенольных соединений по сравнению с контролем 1 (табл. 2). Обработка луковиц растворами солей меди и свинца во всем исследованном диапазоне концентраций приводила к угнетению роста корней, что проявлялось в статистически значимом их укорочении. При добавлении препарата ВЭКШ к растворам солей меди и свинца токсический эффект последних снижался, что подтверждено

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ

ТАБЛИЦА 2. Действие растворов солей тяжелых металлов и водного экстракта куколок шелкопряда на длину корней луковиц, содержание α -аминоазота и суммы фенольных соединений в листьях лука

Номер варианта	Обработка луковиц		Исследуемый параметр		
	CuSO ₄ , мг/л	Pb(NO ₃) ₂ , мг/л	Длина корней, мм	α -Аминоазот, мг/г	Сумма фенолов, %
1	12,5+ВЭКШ		12,0±0,55 ³	8,81±0,29	16,62±0,99 ^{2, 3}
2	12,5		5,42±0,44 ^{1, 3}	7,17±0,18 ¹	24,06±2,42 ^{1, 3}
3	2,5+ВЭКШ		11,01±0,9 ^{2, 3}	8,63±0,99	18,21±1,71 ^{2, 3}
4	2,5		7,32±0,54 ^{1, 3}	8,04±0,15	22,13±2,73 ^{1, 3}
5	1,25+ВЭКШ		12,29±0,77 ^{2, 3}	13,81±1,4 ^{1, 2, 3}	18,30±2,00 ^{2, 3}
6	1,25		9,45±0,92 ^{1, 3}	7,32±0,21	26,86±2,68 ^{1, 3}
7		331+ВЭКШ	12,89±0,91 ^{2, 3}	10,29±2,17	20,03±2,02 ³
8		331	6,58±1,06 ^{1, 3}	8,25±0,43	21,62±2,64 ³
9		33,1+ВЭКШ	8,76±1,07 ^{1, 3}	9,71±1,85	17,88±1,49 ³
10		33,1	7,02±0,87 ^{1, 3}	8,28±0,79	19,34±2,07 ³
11		3,31+ВЭКШ	10,81±1,01 ³	10,42±0,8 ^{1, 3}	17,53±1,35 ³
12		3,31	9,89±0,72 ^{1, 3}	8,44±0,95	24,64±2,37 ^{1, 3}
13	H ₂ O (контроль 1)		12,11±0,60 ³	8,01±0,82	17,47±0,5 ³
14	ВЭКШ (контроль 2)		15,33±0,83	7,62±0,44	34,00±1,93

удлинением корней луковиц до диапазона значений контроля 1. Растворы Pb(NO₃)₂ влияли на рост корней лука более негативно.

Обработка луковиц растворами солей меди и свинца в некоторых вариантах опыта (2, 6) приводила к снижению концентрации α -аминного азота; при дополнительном введении в растворы солей ВЭКШ количество α -аминного азота в листьях лука в большинстве вариантов опыта существенно возрастало. Поскольку зависимость доза—эффект не установлена, можно подтвердить высказанное ранее предположение, что, во-первых, на 9-е сутки эксперимента выявляются не острые эффекты действия химических стрессоров, а эффекты их последствий, во-вторых, характер изменений одного из интегральных показателей азотистого обмена — α -аминного азота свидетельствует в пользу позитивного влияния препарата ВЭКШ на регуляторном уровне. Это подтверждено также характером изменений содержания суммы флавоноидов: практически во всех вариантах опыта на 9-е сутки после обработки луковиц выявлено одинаковое по степени выраженности повышение их содержания, а при введении препарата ВЭКШ в растворы для обработки луковиц концентрация фенольных соединений сохранялась на уровне контроля 1.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы. Биохимические и морфометрические проявления окислительного стресса обнаруживаются в листьях и корнях лука на 9-е сутки после обработки луковиц растворами солей меди (в диапазоне концентраций 1,25—12,5 мг/л) и свинца (в диапазоне концентраций 3,31—331 мг/л) и не подчиняются закономерности доза—эффект. Применение ВЭКШ способствует накоплению фотосинтетических пигментов и фенольных

соединений. Введение в растворы солей меди и свинца стандартизованного по свободным аминокислотам водного экстракта куколок дубового шелкопряда в дозе 55 мг/л предупреждает проявления окислительного стресса на 9-е сутки эксперимента. Полученные данные могут служить обоснованием для изучения протекторного действия ВЭКШ на растительных объектах.

1. Барсукова В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. Аналитический обзор. — Новосибирск: Изд-во ГПНТБСО РАН, 1997. — 63 с.
2. Гринкевич Н.И., Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отрященко В.Э. Химический анализ лекарственных растений. — М.: Высш. шк., 1983. — 176 с.
3. Кочергин Б.Н., Степанова Н.А., Толкачева Т.А., Чиркин А.А. Характеристика жидкого соевого экстракта куколок дубового шелкопряда // Вестн. Витебск. ун-та.— 2012. — № 4 (70). — С. 28—37.
4. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1997. — С. 66—68.
5. Узбеков Г.А. Определение аминного азота в белках и аминокислотах колориметрическим нингидринным методом // Вопросы мед. химии. — 1958. — С. 69.
6. Чиркин А.А., Коваленко Е.И., Толкачева Т.А. Биологическая активность продуктов гистотоллиза. — Germany: Lambert Akad. Publ., 2012. — 156 с.
7. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев: Биохимические методы в физиологии растений. — М.: Наука, 1971. — С. 154—170.
8. Патент РБ 15646 А61К 35/64; А61Р 5/50. Способ получения средства для профилактики инсулинорезистентности / А.А. Чиркин, В.У. Буко, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева, Д.И. Паршонок. — Оpubл. 30.04.2012, Бюл. № 2 (85). — С. 79.
9. Dipierro S., Leonardis S.D. The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers // J. Exp. Bot. — 1997. — 48. — P. 779—783.
10. Fernandes J.C. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants // Bot. Rev. — 1991. — 57. — P. 246—273.
11. Foyer C.H. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // Plant Cell Environ. — 2005. — 28. — P. 1056—1071.
12. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exp. Bot. — 2002. — 53, N 366. — P. 1—11.
13. Himelblau E., Amasino E.R.M. Delivering copper within plant cells // Curr. Opin. Plant Biol. — 2000. — 3. — P. 205—210.
14. Liu D., Jiang W., Zhai L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test // Israel J. Plant Sci. — 1995. — 43. — P. 125—133.
15. Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants // Photosynthetica. — 1997. — 34. — P. 321—342.
16. Nwosu J.U., Harding A.K., Linder G. Cadmium and lead uptake by edible crops grown in a silt loam soil // Bull. Environ. Contam. Toxicol. — 1995. — 54. — P. 570—578.

Получено 26.02.2013

ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ ЛЯЛЕЧОК ДУБОВОГО ШОВКОПРЯДА ЗА ДОПОМОГОЮ МОДИФІКОВАНОГО ALLIUM-ТЕСТУ

Т.О. Толкачова

Вітебський державний університет імені П.М. Машерова

Вивчали морфометричні та біохімічні параметри тест-об'єкта (*Allium cepa* L.) за одноразової 24-годинної обробки солями важких металів ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) і водним екстрактом лялечок дубового шелкопряда. В листках оброблених розчинами солей міді і свинцю цибулин виявлено підвищений вміст ТБК-активних речовин і знижений вміст фотосинтетичних пігментів. Обробка цибулин розчинами солей міді і свинцю в усьому дослідженому діапазоні концентрацій призводила до пригнічення росту коренів, зниження вмісту α -амінного азоту й підвищення вмісту фенольних сполук. У разі добавляння гідрофільних компонентів лялечок дубового шелкопряда до розчинів солей міді і свинцю токсичний ефект останніх зменшувався, а досліджувані показники у багатьох випадках до-

сягали діапазону контрольних значень. Результати виконаних робіт можуть слугувати обґрунтуванням для вивчення протекторної дії водного екстракту лялечок дубового шовкопряда на рослинних об'єктах.

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTION OF WATER EXTRACTS OF OAK SILKWORM PUPAE WITH A MODIFIED *ALLIUM*-TEST

T.A. Tolkacheva

P.M. Masherov Vitebsk State University
33 Moscow pr., Vitebsk, 210038, Belarus

The morphometric and biochemical parameters of the test object (*Allium cepa* L.) in a single 24-hour treatment with salts of heavy metals ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) and aqueous extract of oak silkworm pupae were studied. It was found that in the leaves of treated with salt solutions of copper and lead bulbs, content of TBA-positive substances increased and contents of photosynthetic pigments in leaves decreased. It was revealed that treatment of bulbs with salt solution of copper and lead in the entire range of concentrations leads to the inhibition of root growth, reduction of α -amino nitrogen, and increased content of phenolic compounds. When adding a hydrophilic components of oak silkworm pupae to solutions of salts of copper and lead their toxicity decreased and the studied parameters in many cases have reached the range of control values. The studies can serve as grounds for the investigation of the protective action of an aqueous extract of oak silkworm pupae on plant objects.

Key words: *Allium cepa* L., biological testing, heavy metals, biologically active compositions, *Allium*-test, an aqueous extract of oak silkworm pupae.