

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭПИНА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ *CALENDULA OFFICINALIS* L.

С.Н. Шиш, А.Г. Шутова, Ж.Э. Мазец\*

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь  
e-mail: office@cbg.org.by

\*Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка, Минск,  
Республика Беларусь

### Введение

Одним из приоритетных направлений исследований в настоящее время является разработка отдельных приемов и технологий возделывания различных лекарственных культур в условиях нашей страны, в том числе растений календулы (*Calendula officinalis* L.), с целью создания сырьевой базы для эффективного и устойчивого развития фармацевтической, пищевой, парфюмерной и других отраслей промышленности.

Возделывание лекарственных трав часто осложнено низкой полевой всхожестью данных растений, а также требует современных технологий обработки и хранения семян. Основная проблема заключается в подготовке к высеву долго хранившихся семян, требующих предварительного воздействия для инициирования их «пробуждения» и повышения энергии прорастания.

Повысить качество и полевую всхожесть жизнеспособных семян можно различными способами воздействия на посадочный материал. Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что различные виды обработки семян могут оказывать положительное влияние на активацию ростовых процессов растений [1]. В настоящее время в сельскохозяйственной практике достаточно широко применяются химические регуляторы роста, способствующие повышению энергии прорастания и полевой всхожести семенного материала. Существует большое количество различных регуляторов роста, которые успешно применяются на сельскохозяйственных культурах, однако относительно лекарственных культур конкретные рекомендации отсутствуют. В связи с этим особенно важным на данный момент является выявление стимулирующих веществ, подходящих для разных лекарственных культур, которые будут не только повышать агрономические качества семян, но и положительно влиять на лекарственное сырье.

Одним из перспективных стимуляторов роста может являться экзогенная 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) в низких и сверхнизких концентрациях, поскольку в последние годы для этого соединения, являющегося предшественником в биосинтезе хлорофилла, показаны стимулирующие эффекты на рост и урожайность ряда культур [2]. Широкое использование АЛК сдерживается ее достаточно высокой стоимостью и отсутствием данных о преимуществах ее применения в сравнении с широко используемыми в настоящее время иными стимуляторами роста, такими как эпин (действующее вещество эпибрасинолид), эмистим и др.

Поэтому целью данной работы являлось сравнительная оценка влияния 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и эпина в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-11}$ % на агрономические и некоторые физиолого-биохимические процессы растений *Calendula officinalis* L. сорта «Махровый-2000» в лабораторном и полевом экспериментах.

Для выяснения природы действия используемых регуляторов роста изучался уровень активности первичных маркеров стресса ферментативной природы, таких как каталаза и пероксидаза, которые играют ведущую роль в нейтрализации активных форм кислорода на начальных этапах онтогенеза.

Каталаза (ЕС 1.11.1.6) широко распространена в растительных тканях. Сущность каталитического действия каталазы состоит в разложении перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода. Реакция с участием каталазы требует двух молекул перекиси, из которых одна действует как донор, а другая как акцептор электронов. В живых тканях помимо каталазы перекись разлагается и пероксидазой. Однако было доказано, что каталаза выполняет каталитическую функцию независимо от присутствия пероксидазы. В отличие от

пероксидаз, которые функционируют только при относительно низком уровне пероксида, каталаза способна эффективно работать при его высокой концентрации [3–6].

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) – один из ключевых ферментов, контролирующих рост растений, их дифференциацию и развитие. Этот фермент участвует в формировании, реологии и лигнификации клеточных стенок, биосинтезе этилена, метаболизме индолил-3-уксусной кислоты, дыхании растений, защите тканей от поражения и инфекции патогенными микроорганизмами. Пероксидаза – фермент определяющий рост, развитие и антиоксидантную противострессовую реакцию растения на внешние воздействия. Пероксидаза одной из первых активизируется в растении в ответ на стресс [7].

#### Методы исследований

Объектом для изучения были выбраны растения *Calendula officinalis* L. сорта «Махровый-2000», которая широко используется с лекарственной целью как в народной, так и в традиционной медицине. В качестве сырья употребляют цветочные корзинки *Calendula officinalis* L., собранные в фазе цветения. Цветки календулы содержат около 3% каротиноидов (каротин, ликопин, виолаксантин, рубиксантин), флавоноиды (нарцисин, рамнетин, изорамнетин-3-триглюкозид, изоквертин и др.), эфирное масло (около 0,02%), сапонины, горькое вещество календен, смолистые (до 3,44%) и дубильные вещества, слизь (до 2,5%), камедь, органические кислоты (яблочная, салициловая, пентадициловая, меристиновая, лауриновая, пальмитиновая [8]. В соцветиях этого растения содержится до 2678 мг/100 г аскорбиновой кислоты. Также в цветочных корзинках содержатся ферменты и фитонциды (до 0,09%). Благодаря широкому спектру содержащихся в *Calendula officinalis* L. веществ, она обладает бактерицидными, ранозаживляющими, противовоспалительными свойствами, доказано, что настои, настойки, мази и другие препараты из календулы снижают артериальное давление, замедляют сердечный ритм, увеличивают амплитуду сердечных сокращений, успокаивают нервную систему [8].

Для обработки семян использовались эпин и 5-аминолевулиновая кислота в четырех концентрациях: 1)  $10^{-6}\%$ ; 2)  $10^{-7}\%$ ; 3)  $10^{-9}\%$ ; 4)  $10^{-11}\%$ . Концентрации были выбраны с учетом имеющихся в этой области результатов [2]. Обработка семян для полевого опыта проводилась методом инкрустации с использованием в качестве прилипателя раствора 1% фадекса. Во все инкрустирующие растворы добавляли по 10 1% фадекса. Для лабораторного опыта химическая обработка проводилась методом замачивания семян. Для этого в растворы регуляторов на 3 часа опускались семена, затем их многократно промывали дистиллированной водой и помещали в растительницу.

Полевой опыт был заложен на 2 экспериментальных площадках – на опытном поле агробиостанции «Зеленое» БГПУ им М.Танка, Минский р-н и на опытном участке пряно-ароматических и лекарственных растений лаборатории прикладной биохимии в ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», в четырехкратной биологической повторности. Схема опыта разрабатывалась с учетом агрономических характеристик растений *Calendula officinalis* L. Для посева был выбран рядовой способ посадки семян, по 20 штук на ряду. В ходе опытов оценивалась: полевая всхожесть семян, велось наблюдение за фазами онтогенеза и морфометрическими показателями в течение всего вегетационного периода каждые 7 дней.

Лабораторный эксперимент был заложен в трехкратной повторности для каждого вида обработки. Семена проращивали в растительницах на увлажненной фильтровальной бумаге на протяжении 7 дней при температуре 20–21 С. Каждая партия контрольных и опытных образцов содержала по 50 семян. Оценивали всхожесть и морфометрические показатели корней и проростков на 7 сутки развития. Проросшими считались семена с зародышевым корешком более 0,5 см. В результате эксперимента получены данные о всхожести, морфометрических параметрах ювенильных растений. Также на 7 и 14 дни онтогенеза был проведен биохимический анализ проростков на содержание ферментов антиоксидантной системы защиты растения: пероксидазы и каталазы.

Определение каталазной активности в образцах проводили по модифицированному нами методу на основе методов Chance, Maehly [9] и Aebi [10]. Субстратом служила  $H_2O_2$ , приготовленная на 50 мМоль/л фосфатном буфере (рН 7,0) по прописи из каталога фирмы «Sigma» [11].

Определение активности пероксидаз гаваяколового типа в образцах проводили по Бояркину [12], используя в качестве хромогенного субстрата бензидин.

Опыты проводились в четырехкратной биологической повторности [13]. Полученные результаты обрабатывались с помощью статистического пакета программ M. Excel и Stadia 8.0.

### Результаты и обсуждение

В результате проведения лабораторного опыта установили, что АЛК в изученных концентрациях оказывала неоднозначное влияние на исследуемые параметры у ювенильных растений *Calendula officinalis* L. Установлено, что обработка АЛК практически не влияла на длину проростков спустя 7 суток от начала эксперимента (не выявлено достоверных различий с контролем) (рисунок 1А).

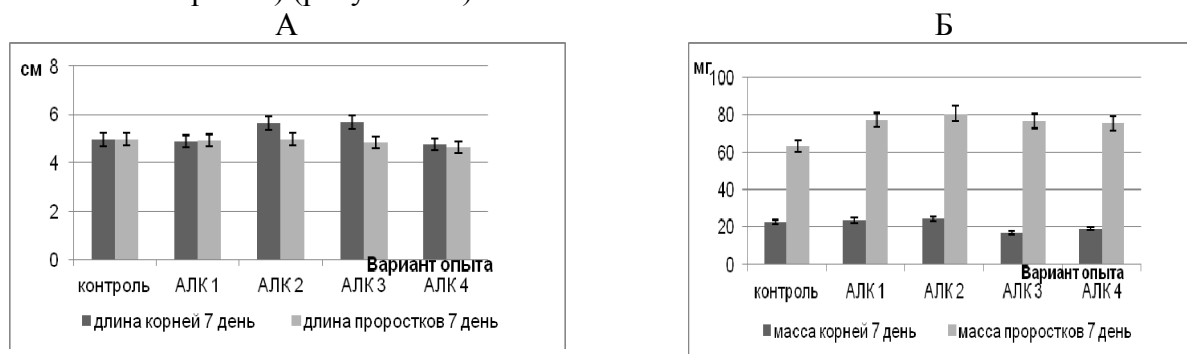


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций АЛК на длину (А) и массу (Б) корней и проростков ювенильных растений *Calendula officinalis* L.

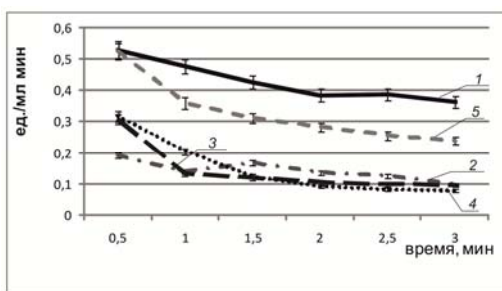
На основании статистического анализа с использованием критерия Стьюдента установлено достоверное увеличение длины корней на 7 сутки при обработке АЛК2 и АЛК3 по сравнению с контролем.

Более выраженное влияние АЛК оказывала на массу 7-дневных проростков. Выявлено, что АЛК во всех концентрациях вызывала увеличение вегетативной массы проростков от 12,2% до 17,4%, что свидетельствовало о ее ростостимулирующей функции в условиях эксперимента. Неоднозначным было влияние АЛК на длину корней. Так, АЛК1 и АЛК2 увеличивали массу проростков (выявлены достоверные различия (при  $p > 0,02$ ), не оказывая достоверных изменений в массе корней (рисунок 1Б), в то время как обработка АЛК3 снижала массу корней (достоверность различий с контролем при  $p > 0,05$ ) на фоне увеличения массы проростков по сравнению с необработанными растениями. Для АЛК4 не установлено достоверных различий в массе корней по отношению к контролю, тогда как масса проростков для этой концентрации АЛК также увеличивалась в сравнении с контрольными значениями.

Отличительной особенностью после обработки АЛК1 и АЛК2 являлось нарастание боковых корней, что способствовало увеличению суммарной массы корневой системы. А значит, можно предположить, что растения после данного воздействия будут более жизнеспособны, ведь скорость роста определяет способность *Calendula officinalis* L. конкурировать в полевых условиях с сорными растениями, что имеет большое значение в первые фазы развития. Наличие дополнительного количества боковых корней увеличивает площадь всасывания и помогает растениям противостоять недостатку влаги в почве, которая на первых неделях развития может являться основной причиной гибели ювенильных растений.

Известно, что регуляторы роста растений могут оказывать не только положительное влияние на растения, но и вызывать стресс, сопровождающийся увеличением уровня активных форм кислорода (АФК), и, соответственно, активизацией системы антиоксидантной защиты растения [14]. Поэтому был проведен анализ содержания каталазы и пероксидазы, участвующих в дезактивации перекиси водорода, образующейся в результате дисмутации супероксидного анион-радикала, как маркеров первичных стрессовых реакций.

В ходе исследований установлено снижение активности каталазы в 7-ми дневных проростках *Calendula officinalis* L. сорта «Махровый–2000» во всех вариантах обработки по сравнению с контролем. Активность фермента каталазы была наиболее низкой в случае первых трех вариантов обработки (рисунок 2).



1 – контроль; 2 – АЛК1; 3 – АЛК2; 4 – АЛК3; 5 – АЛК4

Рисунок 2 – Влияние различных концентраций АЛК на уровень активности каталазы у 7-ми дневных ювенильных растений *Calendula officinalis* L.

Анализ данных опыта показал, что у изучаемых образцов после обработки АЛК1 наблюдалось значительное увеличение концентрации пероксидазы, при незначительном отставании в росте данных растений и максимальной всхожести в лабораторном опыте. Активность пероксидазы в случае остальных вариантов обработки АЛК не превышала уровень контроля (не установлено достоверных различий) (рисунок 3).

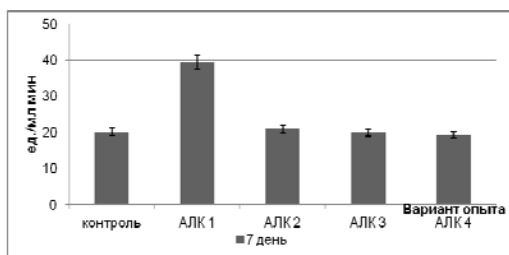
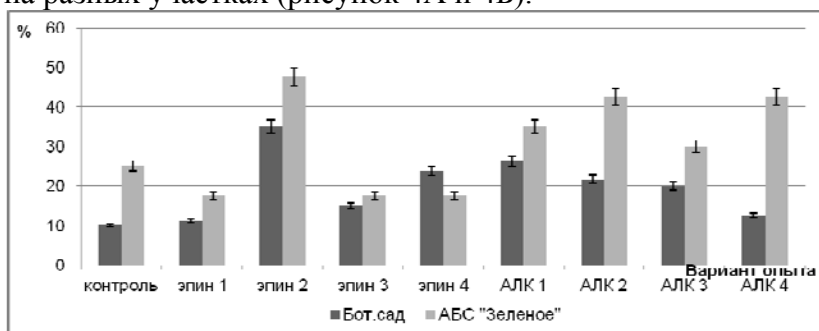
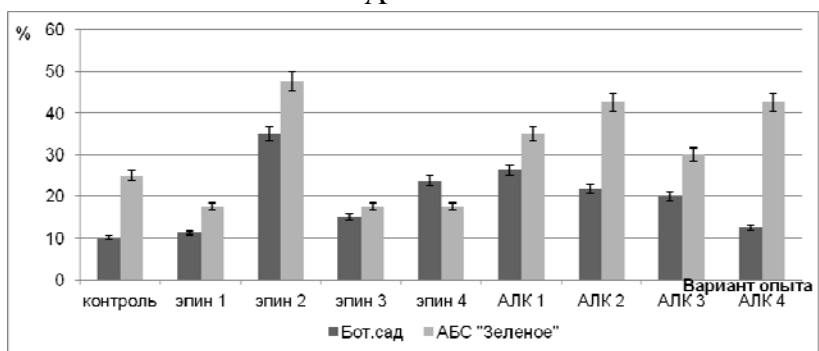


Рисунок 3 – Влияние концентраций АЛК на уровень активности пероксидазы у 7-ми дневных ювенильных растений *Calendula officinalis* L.

В полевом опыте также проводилась оценка влияния эпина и АЛК на рост и развитие календулы. Опыты были заложены на участках с разным механическим составом почв и на значительном друг от друга расстоянии. В результате были получены данные о полевой всхожести и морфометрических параметрах опытных растений. Установлены отличия полевой всхожести на разных участках (рисунок 4А и 4Б).



А



Б

Рисунок 4 – Особенности влияния эпина и АЛК на всхожесть *Calendula officinalis* L. в полевых условиях на 7 (А) и 14 (Б) дни эксперимента

Вторым параметром, который исследовался в полевом опыте, является высота проростков на начальных этапах онтогенеза, что особенно важно для ювенильного этапа, так

как *Calendula officinalis* L. в значительной степени подвержена влиянию сорных растений. Значит, чем быстрее растение растет, тем меньше угнетается сорными травами, а значит, будет более жизнеспособно (таблица 1).

Таблица 1 – Особенности влияние эпина и АЛК на длину проростков (см) *Calendula officinalis* L. в разных полевых условиях

Вариант опыта	Длина проростков, см					
	7 день		14 день		21 день	
	Бот.сад	АБС «Зеленое»	Бот.сад	АБС «Зеленое»	Бот.сад	АБС «Зеленое»
контроль	1,6±0,47	1,5±0,19	2,7±1,16	2,7±0,4	5,7±1,43	3,3±1,19
эпин1	1,6±0,34	1,4±0,1	2,9±0,65	2,3±0,52	5,5±1,3	2,5±0,48
эпин2	1,8±0,24	2±0,17	2,7±0,73	3,1±0,71	5,8±1,7	4,1±0,84
эпин3	1,6±0,36	1,7±0,23	2,8±0,59	2,6±0,47	5,5±1,08	3,1±0,72
эпин4	1,8±0,23	1,7±0,29	2,8±0,75	2,8±0,99	5,7±1,3	3±0,89
АЛК1	1,7±0,26	1,8±0,24	3±0,54	2,9±0,79	5,3±1,3	3,9±0,79
АЛК2	1,7±0,29	2±0,25	3±0,64	3,5±0,6	5,5±1,3	3,9±0,68
АЛК3	1,8±0,45	2,0±0,45	2,7±0,68	3,2±0,61	4,9±1,6	4±1,18
АЛК4	1,6±0,15	1,7±0,35	3±0,83	3,4±0,67	5,7±2,03	3,8±1,4

Сравнив длину проростков контрольных растений на разных полевых участках, установили незначительное отличие в высоте растения на исследуемых площадках в начале развития и увеличение разницы в процессе роста. Так на 21 первый день роста контрольные растения на территории Центрального ботанического сада были практически в два раза выше растений на территории АБС «Зеленое».

По результатам эксперимента выявлены достоверные различия в длине проростков при обработке АЛК2 и эпин2 на 7-е сутки (опытный участок АСБ «Зеленое»).

#### Выводы

Таким образом, выявлено положительное влияние АЛК на ростовые процессы календулы. Можно предполагать, что применение АЛК в качестве стимулятора роста для *Calendula officinalis* L. может представлять определенный интерес, однако необходим тщательный подбор рабочих концентраций, которые будут оптимально улучшать как всхожесть и морфометрические параметры растения, так и сохранять качество лекарственного сырья.

#### Список литературы

1. Калье, М.И. Изменение физиологии прорастающего семени пивоваренного ячменя при действии КВЧ-излучения миллиметрового диапазона / М.И. Калье // Материалы конференции «Медбиотек-2». – Пушино, 2005. – С. 66–69.
2. Аверина, Н.Г. Биосинтез тетрапиролов в растениях / Н.Г. Аверина, Е.Б. Яронская. – Мн: Беларус. наука, 2012. – 413 с.
3. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и окислительная модификация макромолекул: польза вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
4. Мерзляк, М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М.Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20–26.
5. Рубин, Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений / Б.А. Рубин, М.Е. Ладыгина. – М.: Изд-во МГУ, 1974. – 512 с.
6. Ермакова, И.П. Физиология растений: учебник для студентов вузов / И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с.
7. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцибельного формирования САМ / Н.И. Шевякова и др. // Физиология растений. 2002. – Т.49. – № 5. – С. 670–677.
8. Николайчук, Л.В. Лечимся ромашкой и календулой / Л.В. Николайчук, Е.С. Козюк. – Мн.: «Современное слово», 2005. – 192 с.
9. Chance B., Maehly A.C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (ed): Methods in enzymology. Vol. 2. Acad. Press, New York: 764–775.
10. Aebi, H.E. Catalase / H.E. Aebi // Methods in Enzymatic Analyses / Ed. H.U. Bergmeyer – 1955. – Vol. 2. – P. 764–773.
11. Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук: каталог фирмы «Sigma» (США). – 1990. – С. 229.
12. Бояркин, А.И. Биохимия / А.И. Бояркин. – М., 1961. – Т. 16. – № 4. – С. 352.
13. Доспехов, Б.Н. Методика полевого опыта / Б.Н. Доспехов. – М.: Колос, 1979. – 415 с.
14. Образование реактивных форм кислорода в водных растворах под действием электромагнитного излучения КВЧ-диапазона. / М.М. Поцелуева [и др.] // Докл. АН. 1998. – Т. 359, №3. – С. 415–418.