

## Регуляторы роста растений

УДК 633.88:631.8

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОДОБАВКИ НА ОСНОВЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Е.Н. ДИРИНА, А.Ю. ВИНАРОВ, В.И. ОСИПОВ, В.А. БЫКОВ

Изучали влияние разработанной ранее биодобавки Биогидропон — комплекса биологически активных компонентов (регуляторов роста и микроэлементов) на интенсивность роста растений и клеточный метаболизм фенольных соединений. В лабораторных и полевых экспериментах с лекарственными растениями определяли всхожесть и энергию прорастания семян, а также площадь ассимилирующей поверхности растений. При хроматографическом исследовании оценили влияние биодобавки на качественный состав и изменение содержания фенольных соединений в листьях кресс-салата как тестового растения.

**Ключевые слова:** биодобавка для роста растений, регуляторы роста растений, кресс-салат, фенольные соединения, лекарственные растения.

Значительное число отечественных и зарубежных научных публикаций и патентов свидетельствует о практической значимости применения в растениеводстве биологически активных композиций как самостоятельно, так и в сочетании с традиционными органоминеральными удобрениями в виде биодобавок для роста растений (1-6).

Биодобавка Биогидропон относится к классу препаратов на основе стимуляторов (регуляторов) роста растений. Принципы разработки и экспериментального уточнения состава биодобавки с применением экспертного подхода к выбору и конструированию биопрепаратов, а также система их классификации по основному действующему веществу описаны нами ранее (6, 7). Биогидропон содержит комплекс стимуляторов роста, в том числе янтарную и лимонную кислоту, природные гиббереллины, а также набор микроэлементов (бор, молибден, цинк, марганец, медь и др.) для обеспечения ускоренного роста клеток. В состав биодобавки входит также активный регулятор клеточного роста — N-трис-(2-гидроксиэтил)аммонийная соль ортохлорфенилоксиуксусной кислоты. Состав биодобавки и соотношение компонентов защищены патентом РФ и международной заявкой РСТ (8); биотехнология производства согласно разработанному ТУ № 2180-004-41082808-2004 предусматривает получение разных препаративных форм — порошка (при последовательном смешивании компонентов) либо водного раствора.

Цель настоящей работы — изучение влияния биодобавки Биогидропон на всхожесть, энергию прорастания семян и урожайность лекарственных растений, а также исследование ее воздействия на метаболические процессы в растениях.

**Методика.** Влияние биодобавки на энергию прорастания и всхожесть семян лекарственных растений изучали в лабораторных и полевых условиях на опытной базе Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Семена эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*) и наперстянки шерстистой (*Digitalis lanata*) замачивали в 0,005 % растворе биодобавки из расчета 10 мл на 1 г семян (опыт) и в воде (контроль) в течение 5 ч; учитывали энергию прорастания и всхожесть семян, а также массу 10-суточных проростков по общепринятой методике (6).

В полевом опыте семена растений перед посевом замачивали в 0,001 % растворе препарата на 5 ч, вегетирующие растения опрыскивали 0,005 % рабочим раствором дважды — в фазу 2-4 настоящих листьев и через неделю. Площадь делянок 12 м<sup>2</sup>. Наперстянку шерстистую выращивали в течение мая-августа, учитывали площадь листовой поверхности, число листьев на растении и урожайность листа в контрольных и опытных вариантах. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы OriginPro 7.5. Эффективность применения биодобавки оценивали по результатам определения всхожести и энергии прорастания семян, площади ассимилирующей поверхности и урожайности растений.

Накопление фенольных соединений в листьях растений изучали на базе лаборатории органической химии и химической биологии университета г. Турку (Финляндия) с применением авторского метода подготовки проб и хроматографического анализа (9). В качестве тест-растения служил кресс-салат (*Lepidium sativum*) — однолетняя культура из семейства крестоцветных, состав фенольных соединений в листьях которой изучался ранее (10, 11). Биодобавку вносили в прикорневой слой с поливной водой (0,001 % раствор). По окончании эксперимента состав и содержание фенольных соединений определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для этого листья кресс-салата замораживали в жидком азоте, лиофилизировали и растирали до состояния порошка в вибрмельнице (Retch GmbH&Co.KG) с частотой 30 Гц/с в течение 2 мин. Экстракцию метаболитов проводили последовательно 100 и 80 % ацетоном (по 2 раза) в течение 30 мин при комнатной температуре с постоянным перемешиванием (Vortex, Genie 2). Осадок отделяли центрифугированием («Eppendorf», Германия) в течение 15 мин при 2500 g. Объединенный супернатант выпаривали в вакуумном концентраторе 5301 («Eppendorf», Германия), сухой остаток растворяли в 1 мл смеси хлороформа с 80 % метанолом (1:1). Для разделения полярной и липофильной фракций метаболитов к раствору добавляли 0,5 мл 20 % водного метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 5 мин при 2900 g. Нижнюю фракцию (липофильные соединения) переносили в пробирки объемом 1,5 мл; обе фракции выпаривали в вакуумном концентраторе.

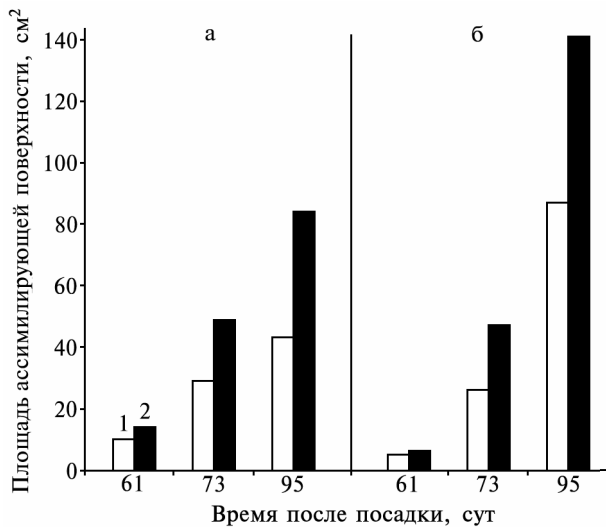


Рис. 1. Площадь ассимилирующей поверхности растений наперстянки шерстистой (а) и эхинацеи пурпурной (б) в контроле (1) и при обработке биодобавкой Биогидропон (замачивание семян и 2-кратное опрыскивание) (2).

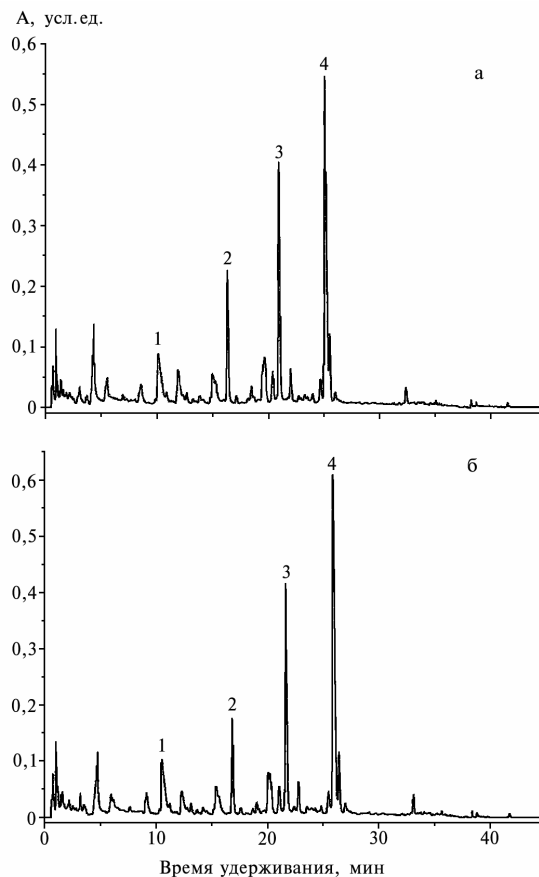


Рис. 2. ВЭЖХ фенольных соединений (полярная фракция) из растений кресс-салата, обработанных 0,001 % раствором биодобавки Биогидропон: а — контроль; б — опыт; 1 — оксibenзойная кислота, 2 и 4 — производные оксикоричных кислот, 3 — флавоноид-С-гликозид (производное апигенина).

Сухой остаток полярных соединений растворяли в 0,5 мл воды. После центрифугирования в течение 10 мин при 2900 g 0,1 мл образца помещали в вials автоматического пробоотборника ВЭЖХ-системы. Липофильную фракцию растворяли в 0,5 мл смеси метанола с ацетоном (9:1), после центрифугирования в течение 10 мин при 2900 g 0,1 мл образца также использовали для ВЭЖХ. ВЭЖХ-система («Merck-Hitachi», Япония) состояла из диодного детектора (diode array detector L-7455), насоса L-7100, автоматического пробоотборника L-7250 и интерфейса D-7000. Фенольные соединения разделяли на хроматографической колонке Superspher 100 RP-18, 75×4 мм («Merck», Германия). Для элюции использовали ацетонитрил (А) и 1 % муравьиную кислоту (Б). Линейный градиент растворителей (объем:объем) создавали в следующем режиме: 0-3-я мин — 2 % А в Б; 3-22-я мин — А от 2 до 15 %; 22-29-я мин — А от 15 до 20 %; 29-35-я мин — А от 20 до 30 %; 35-37-я мин — А от 30 до 70 %; 37-55-я мин — 70 % А в Б; скорость элюции — 1 мл/мин. УФ-спектры определялись автоматически при прохождении максимума каждого пика; регистрация — при  $\lambda = 280$  нм.

**Результаты.** В десяти параллельных лабораторных опытах показали, что у семян эхинацеи пурпурной и наперстянки шерстистой, замоченных в 0,005 % растворе биодобавки, энергия прорастания повышалась соответственно на  $5,7 \pm 0,3$  и  $8,3 \pm 0,5$  %; всхожесть — на  $6,2 \pm 0,3$  и  $14,4 \pm 0,7$  %; масса десяти проростков эхинацеи и наперстянки в опытных вариантах превышала контроль соответственно на  $17,6 \pm 1,8$  и  $28,5 \pm 2,6$  %.

В полевых условиях обработка семян наперстянки шерстистой 0,001 % раствором Биогидропона способствовала появлению всходов на 2-3 сут раньше, чем в контроле; густота стояния в опытном варианте превышала контрольную на 11-12 %; происходило усиление ростовых процессов (площадь листовой поверхности растения была на 39,2 % больше).

Последующая 2-кратная обработка вегетирующих растений повышала положительный эффект: площадь ассимилирующей поверхности возрастала в 1,7-2,0 раза по сравнению с контролем (рис. 1), причем не только за счет площади листовой пластинки, но и вследствие увеличения числа листьев на растении (по датам учета с 10-суточным интервалом соответственно  $10,8 \pm 0,6$  и  $13,6 \pm 0,6$  в опыте против  $7,3 \pm 0,5$  и  $8,9 \pm 0,3$  в контроле). По биомассе травы наперстянка шерстистая в первый год вегетации с применением Биогидропона показала прибавку урожая 38,2 % ( $4,7$  ц/га против  $3,4$  ц/га).

Обработка семян эхинацеи пурпурной раствором Биогидропона способствовала более раннему, чем в контроле, появлению всходов (на 2-3 сут). В опытном варианте густота стояния превышала контроль на  $15,5 \pm 2,6$  %, площадь ассимилирующей поверхности растения — на  $27,2 \pm 3,9$  %. Обработка вегетирующих растений способствовала увеличению площади ассимилирующей поверхности: через 16 сут после второй обработки она была больше контрольной на  $81,8 \pm 8,9$  %, к концу периода вегетации — на  $62,5 \pm 11,1$  % (см. рис. 1).

Известна высокая информативность анализа фенольных соединений для оценки состояния метаболических процессов у растений (12, 13). Поскольку некоторые химические соединения при введении в состав биодобавок даже в минимальных количествах могут неблагоприятно сказываться на дальнейшем использовании растений, дополнительно оценили влияние Биогидропона на состав и содержание индивидуальных фенольных соединений у тестовой культуры — кресс-салата с помощью ВЭЖХ (рис. 2). Анализ УФ-спектров основных фракций не выявил достоверных качественных и количественных изменений фенольных компонентов (по сравнению с контролем) на фоне увеличения урожайности кресс-салата при выращивании с применением биодобавки, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния Биогидропона на метаболизм фенольных соединений у этого растения (рис. 3).

Показано также, что фенольные соединения сосредоточены главным образом во фракции полярных метаболитов, а липофильная фракция содержит их следовые количества, которые можно не учитывать при дальнейшем анализе. До 50 % всех фенольных соединений у растений кресс-салата (как при выращивании с применением биодобавки, так и в контроле) приходилось на производные оксикоричных кислот (время удерживания 26 мин,  $УФ_{\text{макс}}$  244 и 326 нм; время удерживания 17 мин,  $УФ_{\text{макс}}$  242 и 331 нм), производное апигенина — флавоноид-С-гликозид (время удерживания 22 мин,  $УФ_{\text{макс}}$  243, 268 и 333 нм) и оксибензойные кислоты (время удерживания 11 мин,  $УФ_{\text{макс}}$  237 и 283 нм) (см. рис. 2, 3). Структура остальных фенольных соединений, содержание которых не превышало 1-2 % от общего количества, пока не установлена.

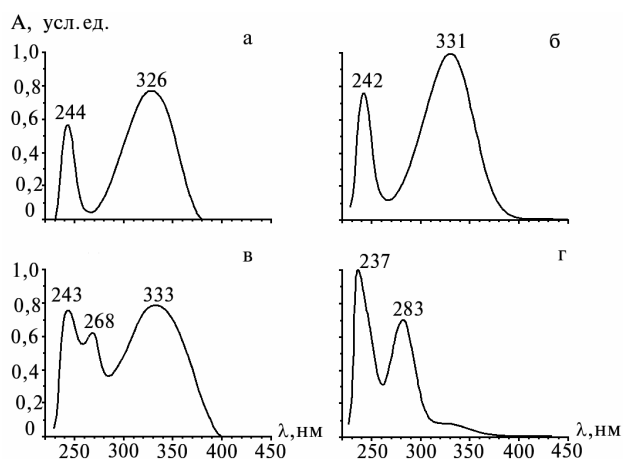


Рис. 3. УФ-спектры основных фенольных соединений из растений кресс-салата: а и б — производные оксикоричных кислот; в — производное апигенина — флавоноид-С-гликозид; г — оксибензойная кислота.

Таким образом, в лабораторных и полевых опытах показано существенное положительное влияние разработанной биодобавки Биогидропон на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на урожайность лекарственных растений — наперстянки шерстистой и эхинацеи пурпурной. Обработка вегетирующих растений 0,005 % раствором биодобавки способствовала увеличению площади ассимилирующей поверхности листьев в 1,7-2,0 раза по сравнению с контролем. Хроматографический анализ количественных изменений содержания фенольных соединений в листьях тест-растений — кресс-салата свидетельствует об отсутствии заметного действия предложенной биодобавки на метаболизм фенольных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wittenmayer L., Merbach W. Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes. *J. of Plant Nutrition and Soil Sci.*, 2005, 168, 4: 531-540.
2. Vahuguz A., Matsubayashi Yo., Ogawa M. et al. Further analogues of plant peptide hormone phytosulfokine-alpha (PSK-alpha) and their biological evaluation. *J. Pept. Sci.*, 2005, 11(9): 589-92.
3. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердинцева Т.А. и др. Микробные продуценты стимуляторов роста растений и их практическое использование. *Прикл. биохим. и микробиол.*, 2006, 42, 2: 133-143.
4. Kennedy I.R., Choudhury A.T.M.A., Kecskes M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. & Biochem.*, 2004, 36, 8: 1229-1244.
5. Beidou X., Guojun Zh., Hongliang L. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste. *J. of Hazardous Materials*, 2005, 124, 1: 165-172.
6. Винаров А.Ю., Дирина Е.Н., Челноков В.В. Биодобавки для роста растений и рекультивации почв. Экспертный подход к выбору и применению. М., 2006.
7. Винаров А.Ю., Дирина Е.Н., Ивашкин Ю.А. Разработка экспертной системы по выбору биодобавок для роста растений. М., 2006.
8. Винаров А.Ю., Джафаров Ш.А., Ипатов Т.В. и др. Препарат для гидропонного выращивания растений. Патент РФ 2286668 от 01.12.2005. Опубл. 10.11.2006. Бюл. 31.
9. Ossipov V., Nurmi K., Loppinen J. et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Chromatog. A*, 1996, 721: 59-68.
10. Justesen U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterization of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. Chromatogr. A*, 2000, 902: 369-379.
11. Lapsic O., Honys D., Koblovska R. et al. Isoflavonoids are present in *Arabidopsis thaliana* despite the absence of any homologue to known isoflavonoid synthases. *Plant Physiol. and Biochem.*, 2006, 44: 106-114.
12. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М., 1993.
13. Waterman P.G., Mole S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Oxford, 1994.

Государственный НИИ биосинтеза белковых веществ,  
109004 г. Москва, Б.Коммунистическая, 27,  
e-mail: Vinarov@hotmail.com;

Университет г. Турку,  
Fin-20014, Финляндия, Турку;

ГУ Всероссийский институт лекарственных и  
ароматических растений,  
123056 г. Москва, ул. Грина, 7

Поступила в редакцию  
10 января 2007 года

## EFFICIENCY OF BIOADDITION ON THE BASIS OF GROWTH REGULATORS AND MICROELEMENTS DURING CULTIVATION OF MIDICINAL HERBS

*E.N. Dirina, A.Yu. Vinarov, V.I. Osipov, V.A. Bykov*

### S u m m a r y

An influence of the bioaddition on plant growth and phenolic components metabolism in plant cells was studied. The bioaddition («Biogidropon» preparation) containing the complex of biological active components and microelements was designed basing on expert approach. The bioaddition promotes an increase of seeds germination and emergence rate by 8-14 %, plants assimilating surface of by 62-95 % (in laboratory and field experiments on medicinal herbs growing). HPLC-DAD analysis of the bioaddition influence on qualitative and quantitative changes of phenolic components in *Lepidium sativum* leaves was conducted. The results shown the absence of significant influence of the bioaddition application on metabolism of phenolic substance in plants, the derivatives of oxcinnaric acids, apigenin and oxybenzoic acid.