

## ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО – МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПРОДУКТИВНЫЕ АСПЕКТЫ

А. А. Дубцова<sup>1</sup>, А. Г. Высоцкая<sup>2</sup>, Т. Г. Щербатюк<sup>2</sup>, А. В. Чурмасов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Поступила в редакцию 8.12.2015 г.

**Аннотация.** Проведены исследования процессов прорастания семян льна масличного в зависимости от различных доз озонного воздействия. Выявлен стимулирующий биологический эффект в отношении интенсивности прорастания семян льна при дозах озонного воздействия  $D=190-750$  мг·мин/м<sup>3</sup> достигающий 16,3-14,5 %. При дозах более 6000 мг·мин/м<sup>3</sup> отмечен подавляющий эффект. Дана оценка изменений биохимических и свободнорадикальных процессов в проростках льна масличного, выращенных из озонированных семян. Установлена оптимальная доза озонного воздействия, повышающая урожай семян на 25,6 %.

**Ключевые слова:** озонирование, лён масличный, биологический эффект, свободнорадикальное окисление, урожайность семян

**Abstract.** The investigation of the processes of germination of seeds of oil flax depending on different doses of ozone exposure. Identified stimulating a biological effect in relation to the intensity of germination of flax seeds at doses of ozone exposure  $D=190-750$  mg·min/m<sup>3</sup> 16,3 up to 14.5 %. At doses of over 6,000 mg·min/m<sup>3</sup> observed inhibitory effect. The estimation of changes in biochemical and free radical processes in the seedlings of flax, grown from seed ozonated. Determined the optimal dose of ozone effects, increases seed yield by 25.6 %.

**Keywords:** ozonation, flax oil, biological effects, free radical oxidation, the yield of seeds

В растительной клетке при нормальных условиях протекают процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), индуцированные образованием активных форм кислорода [1]. ПОЛ в клетках поддерживается в состоянии баланса благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты. Воздействие озона, как стрессового фактора, может привести к перестройке метаболизма растений и смещению про-антиоксидантного равновесия.

Озонирование семян с целью улучшения их посевных качеств и активации ростовых процессов остаётся мало изученным направлением в сельскохозяйственном производстве. При этом каждая с/х культура под действием озона проявляет характерные особенности в изменении ростовых процессов. Уже выявлена роль озона на всхожесть

и интенсивность прорастания пшеницы, гороха, картофеля, облепихи, козлятника, сахарной свёклы, при озонировании семян и клубней [2-4]. В настоящее время влияние озона на процессы жизнедеятельности такого ценного и перспективного для сельскохозяйственного производства и медицины растения, как лён масличный, сорт ЛМ-98 (*Linum usitatissimum* L.) совершенно не изучено.

Цель работы: исследовать влияние озонного воздействия на морфофизиологические показатели и свободнорадикальные процессы прорастающих семян льна масличного.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Озон получали методом барьерного разряда из кислорода воздуха на малогабаритном генераторе озона [5]. Перед закладкой опыта семена раскладывали на фильтровальную бумагу в чашки Петри по 50 штук, далее помещали в специальную камеру с регулируемой концентрацией озона.

© Дубцова А. А., Высоцкая А. Г., Щербатюк Т. Г., Чурмасов А. В., 2016

Концентрацию озона в озono-воздушной смеси (ОВС) определяли оптическим методом с помощью спектрофотометра СФ-26, при длине волны 254 нм. В проведённых экспериментах концентрацию озона изменяли от 19 до 600 мг/м<sup>3</sup>, а время озонирования варьировало от 2,5 до 40 мин. Дозу ( $D$ ) озонного воздействия вычисляли как произведение концентрации ( $C$ ) озона в ОВС на продолжительность ( $t$ ) озонирования:  $D = C \cdot t$ . Контрольные семена действию озона не подвергались. После озонирования в чашки Петри с семенами добавляли по 1 мл дистиллированной воды и проращивали в термостате в темноте при температуре 20-22 °С. Проращивание семян проводилось по общепринятым методикам [6]. Каждый лабораторный опыт с фиксированными значениями озонного воздействия проводили в 10 повторностях.

Затем через 4 дня после закладки опыта у исследуемых проростков определяли морфофизиологические показатели: лабораторную всхожесть, длину и массу проростков; биохимические показатели и свободнорадикальную активность.

Количественную оценку свободных радикалов проростков проводили методом индуцированной хемилюминесценции на биохемилюминометре БХЛ-06 [7]. Свободнорадикальное окисление (СРО) оценивали с помощью следующих параметров:  $I_{\max}$  - максимальная интенсивность свечения исследуемой пробы (мВ);  $S$  - (светосумма, мВ·сек) площадь под кинетической кривой развития хемилюминесценции. Параметр обратен пропорционален общей антиоксидантной активности пробы (ОАА), поэтому для удобства при анализе будем использовать показатель  $1/S$  (отн. ед.);  $tg\alpha_1$  и  $tg\alpha_2$  - тангенсы угла наклона кинетической кривой, характеризующие ингибирующую способность исследуемого продукта. Чем больше эти параметры, тем выше ингибирующая способность продукта.

Определение активности ферментов (пероксидаза и полифенолоксидаза) проводили с использованием фотоколориметрического метода [8].

Для изучения влияния озона на ростовые процессы льна в условиях окружающей среды проводились мелкоделяночные полевые опыты. Все повторения полевого опыта размещали на одном опытном участке ( $S=25$  м<sup>2</sup>). Делянки готовили площадью 1,0 м<sup>2</sup> каждая. Для разграничения опытных образцов между делянками оставляли буферные полосы шириной 20 см. [9]. Норма посева проозонированных и контрольных семян составляла 100 семян/м<sup>2</sup> с глубиной высева 3 см.

После появления всходов, ежедневно, у обработанных и контрольных образцов фиксировали высоту растений. Прополка делянок проводилась вручную. Повторность опыта четырехкратная.

При обработке экспериментального материала определяли биологический эффект (БЭ) озонирования - процент отклонения регистрируемого показателя прорастания от контрольного значения. Статистическая обработка полученных результатов проводилась путём оценки достоверности различий, которую определяли по критерию Стьюдента для уровня значимости  $p \leq 0,5$  [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты опытов по влиянию озона на интенсивность ростовых процессов, отраженных в длинах ( $L$ ) массах ( $m$ ) проростков льна представлены на рисунке 1. При анализе результатов использовали десятичный логарифм дозы ( $lg D$ ).

На рисунке 1 видно, что большие дозы озона  $lg D > 4,00$  ( $D > 12000$  мг·мин/м<sup>3</sup>) подавляют ростовые процессы (кривая 1). При значении  $lg D < 4,0$  зарегистрирован стимулирующий эффект. Причём в интервале  $lg D$  1,68-3,20 этот эффект достоверно отличается от контроля. При дозе  $lg D = 2,28$  ( $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup>) отмечено максимальное значение БЭ( $L$ ), достигающее 16,3 %.

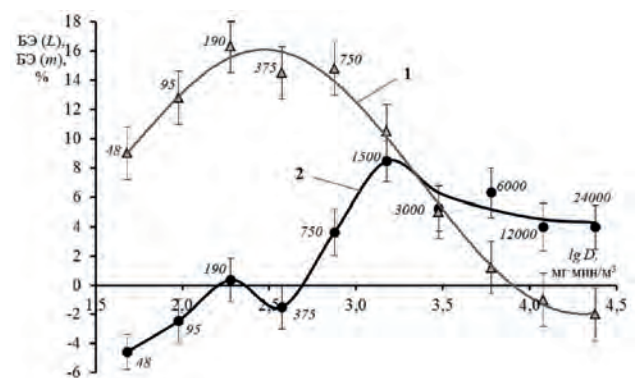


Рис. 1. Зависимость биологического эффекта длины (1) и массы (2) проростков льна от логарифма дозы озонного воздействия на его семена

В отношении массы опытных проростков наблюдается обратная зависимость. Процент отклонения массы проростка в опыте при дозах озона  $lg D$  1,68-2,57 ( $D = 48-375$  мг·мин/м<sup>3</sup>) достоверно ниже его контрольного значения (кривая 2). Положительный БЭ( $m$ ) наблюдается в диапазоне доз озона  $lg D$  2,88-4,38 ( $D = 750-24000$  мг·мин/м<sup>3</sup>). Наибольшее превышение массы проростка над контролем отмечено при дозе озона  $D = 1500$  мг·мин/м<sup>3</sup> и составляет 8,5 %.

Лабораторная всхожесть озонированных семян статически не отличалась от контроля, что, по-видимому, связано с использованием семян последнего срока сбора, всхожесть которых близка к 100 %.

Для дальнейшего анализа были выбраны образцы проростков, выращенных при озонировании семян дозами озона:  $D=190 \text{ мг}\cdot\text{мин}/\text{м}^3$  - соответствующая максимальному стимулирующему эффекту по длине и  $D=6000 \text{ мг}\cdot\text{мин}/\text{м}^3$  - соответствующая началу подавления ростовых процессов от действия ОВС.

Проведённый биохимический анализ тканей всех выделенных групп проростков льна не позволил обнаружить существенных изменений в содержании жира, каротина и макроэлементов, таких как калий и фосфор. Однако содержание кальция у всех озонированных образцов относительно контроля повысилось на 16,7 %. Динамика содержания низкомолекулярных сахаров, крахмала и протеинов в проростках льна в зависимости от действия озона представлена на рисунке 2.

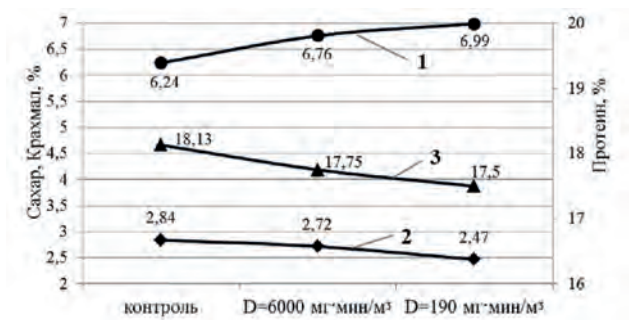


Рис. 2. Динамика содержания сахара (1), крахмала (2), протеина (3) в контроле и проростках льна выращенных из озонированных семян при дозах озона 6000 и 190 мг·мин/м³

Из полученных результатов можно предположить, что при обработке семян озоном у проростков гидролиз крахмала проходил интенсивней контрольной группы. При дозах озона 6000 и 190 мг·мин/м³ содержание крахмала достоверно снижалось относительно контроля на 4,2 и 13,0 % соответственно (рис. 2, кривая 2). Отметим, что в результате ускорения процессов гидролиза крахмала содержание низкомолекулярных сахаров в опытных проростках возросло (рис. 2, кривая 1). Стоит отметить обратную корреляционную связь между показателями по содержанию сахаров и протеинов в проростках льна.

Оценка максимальной интенсивности хемилюминесценции, характеризующая начальные

этапы радикалообразования, позволила определить интенсивность свободнорадикальных реакций в проростках льна масличного в зависимости от дозы озона (рис.3 а). Зарегистрировано, что при озонировании семян в их проростках значение показателя  $I_{\text{max}}$  по сравнению с контролем повышается для дозы озона 190 мг·мин/м³ на 36,2 %, а для  $D=6000 \text{ мг}\cdot\text{мин}/\text{м}^3$  на 15,8 %. Чем выше показатель  $I_{\text{max}}$ , тем больше свободных радикалов образуется в проростках и как следствие возрастает интенсивность ПОЛ.

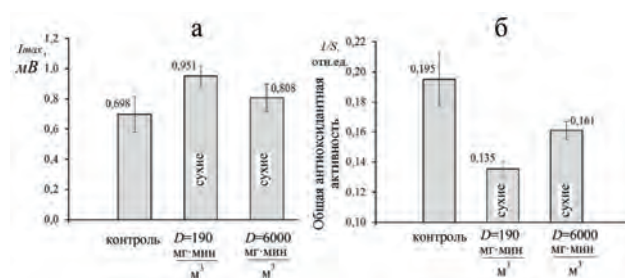


Рис. 3. Максимальная интенсивность хемилюминесценции (а) и общая антиоксидантная активность (б) экспериментальных проростков выращенных из семян при озонировании дозами 190 и 6000 мг·мин/м³

Изменение состояния антиоксидантной системы защиты в проростках льна от действия озона оценивали по ОАА, значению тангенса угла наклона кинетической кривой и активности ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы.

Значения тангенсов угла наклона кинетической кривой ( $tga_1$  и  $tga_2$ ), достоверно возрастают для всех исследуемых образцов (табл.1). Причём максимальные значения данных показателей и соответственно наибольшая ингибирующая способность, отмечены для проростков, у которых от действия озона наблюдается максимальный стимулирующий биологический эффект по длине  $D=190 \text{ мг}\cdot\text{мин}/\text{м}^3$ .

Таблица 1  
Тангенсы угла наклона кинетической кривой развития хемилюминесценции ( $tga_1$  и  $tga_2$ ) (различия достоверны при  $p \leq 0,05$ )

Образцы, мг·мин/м³	$tga_1 \pm \Delta tga_1$ , рад.	$tga_2 \pm \Delta tga_2$ , рад.
Контроль	1.128±0.271	-0.237±0.064
D=190 мг·мин/м³	1.551±0.172	-0.295±0.039
D=6000 мг·мин/м³	1.284±0.214	-0.253±0.072

При озонировании семян в исследуемых проростках льна наблюдается достоверное снижение



общей антиоксидантной активности по сравнению с контролем (рис. 3 б). При дозе  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup> у проростков выявлена наименьшая ОАА, которая ниже контроля на 30,8 %.

В таблице 2 отображены данные об активности антиоксидантных ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы в проростках озонированных семян. В опытах выявлено достоверное снижение активности обоих ферментов по сравнению с контролем.

Для того чтобы узнать, как отразились морфометрические и биохимические изменения в проростках озонированных семян на их дальнейший рост и развитие, провели мелкоделяночные полевые опыты. Посев контрольных и обработанных озоном семян ( $D=190$  и  $6000$  мг·мин/м<sup>3</sup>) в подготовленные делянки проводился в первой декаде июня.

Таблица 2

Активность антиоксидантных ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы для исследуемых групп проростков (различия достоверны при  $p \leq 0,05$ )

Образцы	Активность пероксидазы, отн.ед.	Активность полифенолоксидазы, отн.ед.
Контроль	0.243±0.007	0.409±0.010
$D=190$ мг·мин/м <sup>3</sup>	0.110±0.005	0.320±0.009
$D=6000$ мг·мин/м <sup>3</sup>	0.160±0.009	0.155±0.007

В ходе полевых испытаний было отмечено, что самая высокая всхожесть наблюдалась у образцов с  $D=190$  –  $68 \pm 3$  %, наименьшая у образцов с  $D=6000$  –  $45 \pm 5$  % (контроль –  $60 \pm 3$  %).

Полученные результаты средних длин растений, за период от появления всходов до начала цветения, представлены в виде значений биологического эффекта по высоте стояния растения (рисунки 4).

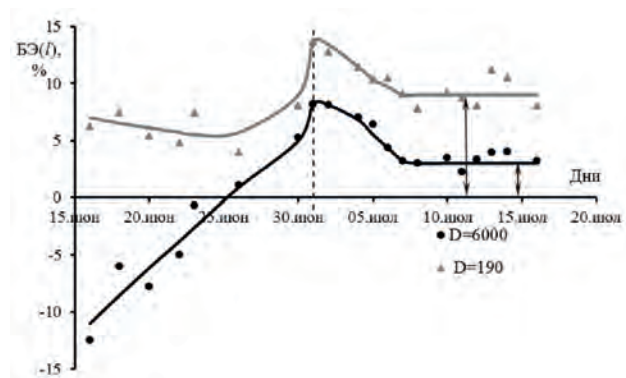


Рис. 4. Графики биологического эффекта по высоте растений, выращенных из семян, обработанных дозой озона  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup> и  $D=6000$  мг·мин/м<sup>3</sup> в зависимости от даты наблюдений

Как видно из графиков на начальных стадиях роста (16 июня) всходы льна, обработанные дозой озона  $D=6000$  мг·мин/м<sup>3</sup> существенно отстают в развитии относительно контроля  $БЭ(л) = -12,0$  %, а у семян обработанных дозой озона  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup> отмечается положительный биологический эффект по высоте растений, составляющий  $БЭ(л) = 7,5$  %. К 26 июня опытные растения  $D=6000$  переходили в стадию интенсивного роста и начинали перерастать контроль, а для образцов  $D=190$  темп роста менялся незначительно.

К дате 1 июля (25 дней от посева) у озонированных образцов относительно контроля наблюдали выраженные пики: для  $D=190$  значение пика составляло 13,6 %, для  $D=6000$  – 8,2 %. Через несколько дней пики плавно опустились до определенного уровня, с сохранением стабильной тенденции превышающей контроль, для растений  $D=190$  в среднем на 9,0 %, для  $D=6000$  на 3,0 %.

Появление у озонированных образцов выраженных пиков можно обосновать тем, что у них фаза «елочки» заканчивается раньше, чем у контроля. После прохождения фазы «елочки» у льна наступает фаза максимального прироста, характеризующаяся высокими темпами роста растения в высоту, и продолжается вплоть до начала цветения. Как только контрольные растения переходят в фазу максимального прироста, они начинают догонять озонированные образцы в высоту и пики плавно опускаются.

После наступления фазы цветения, измерения высоты растений прекращали. Дальнейшие исследования продолжались в период созревания семян, путем сбора их урожая. Результаты, полученные после сбора урожая семян льна, представлены в таблице 3.

У опытных образцов  $D=190$  количество коробочек на одном растении превышает другие исследуемые образцы и составляет в среднем  $160 \pm 13$  штук, что выше контроля на 10,3 %, для  $D=6000$  это значение ниже контроля и равно  $130 \pm 11$  шт. Самый высокий урожай получен у образцов  $D=190$  –  $506 \pm 49$  г/м<sup>2</sup>, за счёт повышенной всхожести и большего количества коробочек на растении, чуть ниже –  $403 \pm 56$  г/м<sup>2</sup> у контроля. Самый низкий урожай –  $271 \pm 52$  г/м<sup>2</sup>, полученный у образцов  $D=6000$ , связан с двумя факторами: низкой полевой всхожестью ( $45 \pm 5$  %) и меньшим содержанием коробочек на растении ( $130 \pm 11$  шт.). Получили, что при предпосевном озонировании семян дозой  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup> урожайность семян повышается на 25,6 %.

Опытные данные, полученные после сбора урожая семян льна

Образец	Среднее кол-во коробочек ( $\bar{N} \pm \Delta N$ ), шт./раст.	Среднее кол-во семян в коробочке ( $\bar{n}$ ), шт.	Среднее кол-во семян на растение ( $\bar{N} \cdot \bar{n}$ ), шт.	Масса 1000 семян ( $m$ ), г	Урожай семян, г/м <sup>2</sup> $y = \frac{\text{Всхож.} \cdot \bar{N} \cdot \bar{n} \cdot m}{1000}$	Содержание жир, г/кг
Контроль	145±13	6±0.2	873±78	7,70±0,01	403±56	398.0
D=190	160±13	6±0.2	961±75	7,75±0,02	506±49	407.0
D=6000	130±11	6±0.2	783±63	7,70±0,01	271±52	391.0

Для полученного урожая семян провели анализ на содержание жира, важного показателя для масличных культур. У семян собранных с образцов  $D=190$  относительно контроля наблюдается повышение жира на 2.3 %, а для семян собранных с образцов растений  $D=6000$  содержание жира снижается на 1,8 %.

Как видно из полученных результатов изменение метаболической активности опытных проростков на стадиях прорастания отразилось в дальнейшем на полевой всхожести, характере развития растений и урожае семян. Можно предположить, что в процессе роста и развития у растений, выращенных из семян, обработанных дозой озона  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup>, увеличивается синтез гормона цитокинина, отвечающего за клеточное деление, активацию ростовых процессов и активное развитие семян и плодов [10, 11].

Анализируя результаты собственных исследований и результаты, полученные учёными для других сельскохозяйственных культур [2, 3, 4, 12] можно заключить, что озон способен выступать как инициатор пусковых механизмов прорастания и регулировать их морфофизиологические процессы. Стоит отметить схожие данные по влиянию озона на с/х культуры. К примеру, в исследованиях Д.В. Данилова [4] выявлено, что обработка семян сахарной свёклы ОВС повышает энергию прорастания и интенсификацию роста.

В опытах М.А. Сигачёвой [12] под влиянием предпосевного озонирования в исследуемом растительном материале снижалось содержание крахмала, содержание сахаров увеличивалось. Аналогичные результаты получены в наших исследованиях и в работах А.А. Гавриловой [3].

Анализируя труды [1, 10, 11] установили, что под действием стрессовых факторов в растениях возникают процессы свободнорадикального окисления аналогичные тем, которые получены в наших исследованиях.

## ВЫВОДЫ

- Выявлен стимулирующий эффект в отношении интенсивности прорастания семян льна при дозах озонного воздействия 90 - 750 мг·мин/м<sup>3</sup>. Процент отклонения от контроля при этих дозах составляет 12.8-16.3 %.

- На фоне увеличения количества свободных радикалов и соответственно инициации ПОЛ озном в проростках льна наблюдается значительное снижение общей антиоксидантной активности.

- Наибольшая полевая всхожесть, наилучшие показатели роста и развития растений в длину, а также самый высокий урожай семян получен у растений льна, выращенных из семян, обработанных дозой озона  $D=190$  мг·мин/м<sup>3</sup>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / О.Г. Полесская // Под ред. И.П. Ермакова. — М: КДУ, 2007. — 140 с.
2. Резчиков, В.Г. Влияние озона на прорастание семян гороха и облепихи / В.Г. Резчиков А.В. Чурмасов, А.А. Гаврилова, Е.А. Соколова // Техника в сельском хозяйстве. — 1998. — № 3. — С. 14–17.
3. Гаврилова А.А. Эколого-физиологические особенности действия озона и информационных СВЧ и КВЧ электромагнитных излучений на модельные биосистемы: дис. на соиск. учен. степ. канд. био. наук : 03.03.01 / Гаврилова А.А. ; Нижегородская гос. с.х. академия. — Нижний Новгород, 2012. — 173 с.
4. Данилов Д.В. Влияние физических факторов и озono-воздушного потока на посевные качества семян и урожайность корнеплодов сахарной свёклы: автореф. дисс. ... канд. сельс. наук / Д.В. Данилов; Ставропольский ГАУ. — Ставрополь, 2010. — 24 с.
5. Резчиков В.Г. Генератор для получения озono-воздушной смеси и его применение. / В.Г. Резчиков, А.В. Чурмасов, А.А. Гаврилова // Тез докл.

II Нижегород. Сессии молодых ученых, Н.Новгород, 1977. — С. 223.

6. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. — М.: Стандартинформ, 2011. — 30 с.

7. Патент РФ № 2284027, МПК С1 2284027. Способ количественной оценки свободных радикалов в пшеничных зародышах методом хемилюминисценции. Шевцов А.А., Зяблова Т.В., Бондаренко О.А., Капранчиков В.С., Фролова Л.Н. Опубл. 20.09.2006. Бюл. № 26. — 6 с.

8. Методы биохимического исследования растений. Изд. 2-е, перераб. и доп. Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: «Колос», 1972 — 456 с.

*ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»*

*Чурмасов А. В., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедры физики и прикладной механики.*

*Тел.: 8(831) 462-70-01*

*Дубцова А. А., аспирант, старший лаборант кафедры физики и прикладной механики*

*Тел.: 89601875613*

*E-mail: dubtsova1988@mail.ru*

*ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»*

*Щербатюк Т. Г., доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биологии.*

*Тел.: 8(831) 438-02-05*

*Высоцкая А. Г., Аспирант кафедры биологии.*

*Тел.: 8(831) 438-02-05*

9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. — М.: ИД Альянс, 2011. — С. 352.

10. Медведев С.С. Физиология растений. Учебник для университетов / С.С. Медведев. — С.-Пб.: Изд-во СПбГУ, 2004. — 336 с.

11. Физиология растений: учебник для студентов вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др.; под ред. И.П. Ермакова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 640 с.

12. Сигачёва М.А. Влияние предпосевного озонирования семян на урожайность и качество зерна яровой и мягкой пшеницы в кузнецкой лесостепи: дис. ... канд. с/х наук: 06.01.01 / М.А. Сигачёва. — Кемерово, 2014. — 152 с.

*Nizhny Novgorod State Agricultural Academy  
Churmasov A. V., Doctor of Biological Sciences,  
Professor, head to the chair of Physics and Applied  
Mechanics*

*Ph.: 8(831) 462-70-01*

*Dubtsova A. A., post-graduate student. Senior  
assistant in the chair of Physics and Applied  
Mechanics.*

*Ph.: 89601875613*

*E-mail: dubtsova1988@mail.ru*

*Nizhny Novgorod State Medical Academy  
Shcherbatyuk T. G., doctor of biological Sciences,  
Professor, head of Department of biology*

*Ph.: 8(831) 438-02-05*

*Vysotsky Alexandra G., post-graduate student,  
department of biology.*

*Ph.: 8(831) 438-02-05*