

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФУНГИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

Набеева Р.А.<sup>1</sup>, Федяев В.В.<sup>1</sup>, Фархутдинов Р.Г.<sup>1</sup>, Ярмухаметова И.А.<sup>1</sup>, Хайруллина Р.Р.<sup>2</sup>, Ямалеева А.А.<sup>1</sup>, Ибрагимов А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Башкирский Государственный Университет, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 33, e-mail: regina-24-@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБУН Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук 450075, г. Уфа, пр. Октября, 141

На проростках пшеницы, семена которых подвергались предпосевной обработке - потенциальными фунгицидными препаратами аминного ряда: 1,3 -аминосульфида ди-{ 4-[(тетрагидро-4н-1,4-оксазин-4-ил)-метилсульфанил]-фенилового} эфир щавелевокислый) и производного бисамина и тиомочевини - ([N,N'-бис(диметиламинометил)-тиомочевинощавелевокислый]сульфата меди пентагидрата), а также выпускаемыми промышленностью, известными фунгицидными препаратами марок «Бисол», «Купробисан» и регулятора роста «Биодукс» было изучено их действие на окислительно-восстановительный обмен. Установлена высокая скорость образования супероксид-аниона в проростках пшеницы, при предпосевной обработке «Бисолом» и 1,3 - аминосульфидом - ди-{ 4-[(тетрагидро-4н-1,4-оксазин-4-ил) - метилсульфанил] - фенилового} эфир щавелевокислый). Показан различный характер активности ферментов каталазы и пероксидазы в побегах и корнях проростков после предпосевной обработки изучаемыми препаратами. Таким образом, предпосевная обработка препаратами разных биологически активных химических соединений с фунгицидной активностью приводит к значительным изменениям в работе про-/антиоксидантную системы проростков пшеницы, в функционировании системы образования и разрушения некоторых активных форм кислорода, в оценке эффективности её работы по накоплению продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида (МДА) и в морфометрических показателях.

Ключевые слова: фунгицидные препараты, «Биодукс», «Купробисан», «Бисол», активные формы кислорода окислительно-восстановительная система растений.

## INFLUENCE OF SOME FUNGICIDE ON THE REDOX EXCHANGE WHEAT GERM

Nabeeva R.A.<sup>1</sup>, Fedyaev V.V.<sup>1</sup>, Farkhutdinov R.G.<sup>1</sup>, Jarmuhametova I.A.<sup>1</sup>, Khairullina R.R.<sup>2</sup>, Yamaleeva A.A.<sup>1</sup>, Ibragimov A.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State University, Ufa, Russia, e-mail: regina-24-@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

In wheat seedlings, the seeds of which were subjected to preliminary treatment - potential fungicidal agents amine number: 1.3 -aminosulfid di { 4-[(tetrahydro-4n-1,4- oxazin-4-il)- methylsulfanyl]- phenyl} ester oxalate) and a thiourea derivative and bisamino - ([N,N'-bis(dimetilaminometil)- thiourea oxalate] sulphate copper pentahydrate) and the commercially known fungicidal agents marks "Bisol," "Kuprobisan" and growth regulator "Bioduks" was studied their effect on the redox metabolism. The high rate of superoxide anion in wheat seedlings, preliminary treatment "Bisol" and 1.3 -aminosulfid - di { 4-[(tetrahydro-4н-1,4- oxazin-4-il)- methylsulfanyl]- phenyl} ester oxalate). It shows the different nature of the activity of enzymes catalase and peroxidase in the shoots and roots of seedlings after seedbed study drug. Thus, pre-treatment with preparations of different biologically active chemical compounds with fungicidal activity leads to significant changes in the pro- / antioxidant system of wheat germ, in the functioning of the education system and the destruction of some of the reactive oxygen species, to assess the effectiveness of its work on the accumulation of lipid peroxidation product - malondialdehyde (MDA) and morphometric parameters.

Keywords: antifungal drugs, "Biodux", "Kuprobisan", "Bisol", reactive oxygen species, redox system of plants.

Вопросы защиты сельскохозяйственных растений является актуальными, так как ежегодно от инфекционных болезней растений Россия теряет от 8.5 до 25 млн. т. зерна, при этом на долю потерь от корневой гнили приходится до 50 % урожая. Чаще всего используют различные фунгициды, протравливание семян играет важную роль, а иногда решающую роль

в профилактике грибных болезней. Несмотря на существование большого количества фунгицидов, поиск и синтез новых препаратов с годами не становится меньше, что связано с ростом резистентности фитопатогенов к химическим средствам защиты.

Весьма перспективными являются соединения, содержащие в своей структуре атомы азота и серы, которые согласно литературным данным являются эффективными средствами защиты растений, обладающие противогрибной активностью [4]. Так известно, что ароматические сульфиды и дисульфиды проявляют не только инсектицидное и акарицидное действие, но и являются активными фунгицидами. Однако, наибольшее число сульфидов алифатического, ароматического и гетероциклических рядов, дисульфидов, а также трисульфидов предложены в качестве фунгицидов. Известно, что некоторые производные тиомочевины обладают рострегулирующей и фунгицидной активностью [10].

Использование новых препаратов непосредственно затрагивает окислительно-восстановительную систему растений. Активные формы кислорода (АФК) занимают особое место среди стрессовых метаболитов. К числу АФК относят производные кислорода радикальной природы - супероксид-радикал, гидропероксидный радикал, гидроксил-радикал, а также – перекись водорода, синглетный кислород и пероксинитрит [8].

Недостаточно исследовано влияние на окислительно-восстановительный обмен здоровых растений известных препаратов «Бисол» и «Купробисан», являющихся эффективными, малотоксичными и экологически сбалансированными регуляторами [1], а также новых серосодержащих аналогов «Бисола» и «Купробисана» с более высокой направленной фунгицидной и ростостимулирующей активностями [4].

Цель настоящего исследования состояла в определении влияния потенциальных фунгицидов: «1,3-аминосульфида», производного бисамина и тиомочевины и известных препаратов «Бисол», «Купробисан», «Биодукс» на состояние про-/антиоксидантной системы здоровых растений, функционирование системы образования и разрушения некоторых активных форм кислорода и эффективность её работы по накоплению продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА), а также их влияния на морфометрические показатели растений.

#### **Методика исследований**

Работа проводилась на растениях мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Башкирская 26). Семена стерилизовали раствором гипохлорита натрия (использовался 5 %-й раствор коммерческого отбеливателя «Белизна»).

При использовании «Купробисана» ((N, N'-тетраметилметилendiаминщавелевокислый) сульфат меди пентагидрат) (1), производного бисамина и тиомочевины ([N,N'-бис(диметиламинометил)-тиомочевинощавелевокислый] сульфата меди пентагидрата) (2),

«Бисола» (N, N-тетраметилендиамин), (4), «1,3-аминосульфида» (ди-{ 4-[(тетрагидро-4н-1,4-оксазин-4-ил)-метилсульфанил]-фенилового} эфир щавелевокислый) (5) применяли предпосевное замачивание семян в 0,01%-ом растворе в течение 24 ч, а «Биодукс» (р-р арахидоновой кислоты – *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота) (3) выдерживали в 0,03 % растворе в течение 24 ч. Далее семена на сутки помещали в темный термостат при температуре 26°C. Одинаково развитые проростки, затем выращивали в условиях водной культуры с использованием питательного раствора Хогланда-Арнона на светоплощадке (освещенность 120 Вт/м<sup>2</sup>; световой период 12 ч; средняя температура воздуха 24 ±2°C).

В ходе эксперимента регистрировали изменение сырой и сухой массы, длины побега и корня растений. Скорость образования супероксид-аниона определяли методом, основанного на определении окрашенного продукта окисления адреналина – адренохрома [8]. Содержания перекиси водорода измеряли по его реакции с ксиленоловым оранжевым [5]. Выделение ферментов проводили путем растирания побегов и корней в экстрагирующем буфере (0,1 М фосфатный буфер, рН 7, содержащий 0,01 мМ ЭДТА и 0,1% Triton X-100) [10]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали методом, основанным на способности СОД конкурировать с нитросиним-тетразолием (НСТ) за супероксид-анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклотида (NADH) и феназинметасульфата (ФМС). Пероксидазную активность определяли по образованию окрашенной формы гваякола. Измерение активности каталазы проводили методом, основанным на образовании окрашенного продукта реакции молибдата аммония и перекиси водорода. Измерение концентрации малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [6]. Измерения проводили в 4-кратной биологической и 3-6-кратной аналитической повторности. На рисунках представлены средние арифметические значения и ошибки средней.

### **Результаты и обсуждение**

Проведенные исследования показали, что изменения в окислительно-восстановительной системе яровой пшеницы под действием изучаемых препаратов носили органоспецифический характер, а изменения морфофизиологических параметров растений пшеницы разнонаправленны.

Определение длины побега и корней показало, что стимуляция роста побега в длину наблюдалась при использовании препаратов, «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4) и «1,3-аминосульфид» - (5). При обработке препаратом (2) наблюдалось ингибирование роста корней (табл. 1). Накопление сырой массы корней и побегов наблюдалось при действии препаратов «Биодукс» - (3) и «1,3-аминосульфид» - (5). У растений, выросших после

замачивания семян препаратом «Купробисан» - (1), и производного бисамина и тиомочевины - (2), длина побега и корней были на уровне или ниже контрольных значений.

**Таблица 1**

Морфометрические различия при предпосевной обработке семян пшеницы потенциальными фунгицидными препаратами (1-5) (% от контроля)

Вариант обработки	Длина побега	Длина корня	Сырая масса побега	Сырая масса корня
1	100.1±1.0	91.8±1.0	98.8±1.2	99.3±1.0
2	94.8±0.9	79.5±1.2	95.2±1.1	85.7±1.1
3	105.9±1.1	100.1±0.9	105.3±0.9	102.1±0.8
4	107.1±1.2	99.5±1.0	99.7±1.1	99.1±0.9
5	114.5±1.0	109.7±0.8	111.3±1.0	103.5±1.0

«Купробисан» - (1), «производное бисамина и тиомочевины» - (2), «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4), «1,3-аминосουλфид» - (5).

Наиболее высокая скорость образования супероксид-аниона отмечена при предобработке семян препаратом «1,3-аминосулфид» - (5), при этом величина показателя была выше в побегах на 18.4 %, корнях – на 45.4 % по сравнению с контролем (рис.1а). Близкие значения были установлены и при действии препаратов 3 и 4 (рис.1а). Таким образом, можем предположить, что данное соединение стимулирует локальный синтез АФК. Скорость образования супероксид-аниона при использовании исследованных препаратов возрастала в ряду (Купробисан - (1), производное бисамина и тиомочевины (2) – Бисол – Биодукс – 1,3-аминосулфид (5)). Обработка семян пшеницы препаратами «Купробисан» - (1), «производного бисамина и тиомочевины» - (2), вызывала эффект уменьшения образования супероксид-аниона. Величина данного показателя была ниже контроля в побегах у растений, выросших при действии препаратов «Купробисан» - (1), на 23.9 %, в корнях на 9.2 % и на фоне «производного бисамина и тиомочевины» - (2) на 34.5% и 23.3 % соответственно.

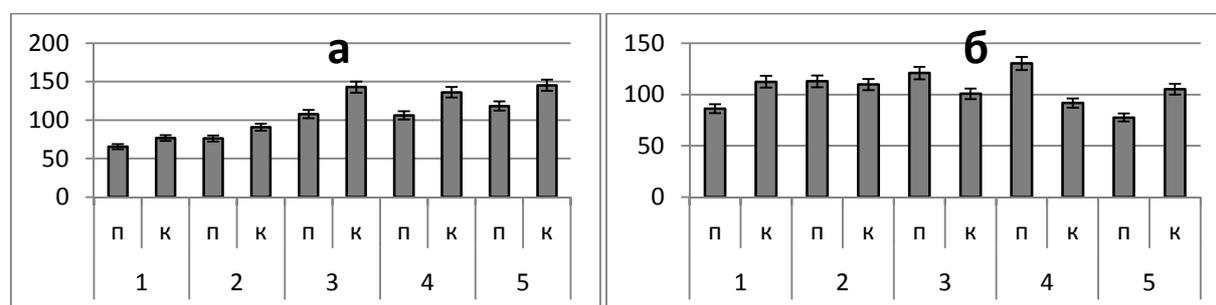


Рис. 1 Влияние предпосевной обработки потенциальными фунгицидными препаратами (1-5) на скорость образования супероксид-аниона (а) и активность фермента супероксиддисмутазы (СОД) (б) в побегах и корнях проростков пшеницы (% от контроля) п – побег, к – корень. («Купробисан» - (1), «производное бисамина и тиомочевины»- (2), «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4), «1,3-аминосулфид» - (5)).

В литературе существует немало доводов в пользу физиологической роли супероксид-аниона в процессах онтогенеза. Полагают, что он участвует в растяжении листовых пластинок растений [2]. Нами был проведен сравнительный анализ зависимости между содержанием супероксид-анионов и ростовыми показателями корней и побегов растения (табл.1, рис. 1а).

Показано, что высокое содержание супероксид-аниона соответствовало высоким морфометрическим показателям, что подтверждает ранее предложенное мнение Колупаева [2]. Известно, что АФК участвуют в передаче сигналов, приводящих к активации ферментов-антиоксидантов и/или экспрессии их генов [7]. Видимо, окислительная реакция запускает механизмы защиты растения. В детоксикации АФК принимают участие высокомолекулярные ферменты-антиоксиданты, среди которых важная роль играют супероксиддисмутаза, каталаза, группа пероксидаз, ферменты аскорбат-глутатионового цикла. В дисмутации супероксидных радикалов участвуют три изоформы супероксиддисмутазы. В результате дисмутации супероксид-радикалов под действием разных изоформ СОД происходит образование перекиси водорода. Главным звеном антиоксидантной защиты растений является группа ферментов, ликвидирующих перекись водорода.

Определение содержания супероксиддисмутазы (СОД) показало разный характер активности этого антиоксидантного фермента: так большая активность фермента в побегах наблюдалась при использовании препаратов Биодукс» - (3) > «Бисол» - (4) > «производное бисамина и тиомочевин» - (2), что было выше значения контроля на 20.9 % >30.2 % >12.8 % соответственно (рис.1б). Предобработка препаратами («Купробисан» - (1) и «1,3-аминосульфид» - (5) снижала активность СОД в побегах на 13.8 % и 22.5 % соответственно (рис 1б). В то время как влияние препаратов («Купробисан» - (1), «производное бисамина и тиомочевин» - (2), «1,3-аминосульфид» - (5) привело к активации фермента в корнях проростков пшеницы на 5.1 - 12.5 %. Воздействие препарата «Бисол» - (4) отличалось от действия других препаратов, мы наблюдали снижение активности СОД в корнях на 8.4 %.

Известно, что супероксид-анион может иметь свои сенсоры, которые выполняют регуляторную роль [2]. Детально изучена сигнальная роль перекиси водорода, что вероятно, связано с относительной стабильностью данной молекулы. В литературе имеются данные о стимулирующем влиянии перекиси водорода на рост растений [2]. Изучение содержания перекиси водорода показало, что обработка всеми исследуемыми препаратами снижала содержание перекиси водорода, наименьшее содержание перекиси водорода характерно для растений, обработанных соединением «1,3-аминосульфид» - (5), содержание перекиси в побегах и корнях было ниже контроля на 31.6 % и 22.7 % соответственно (рис.2а).

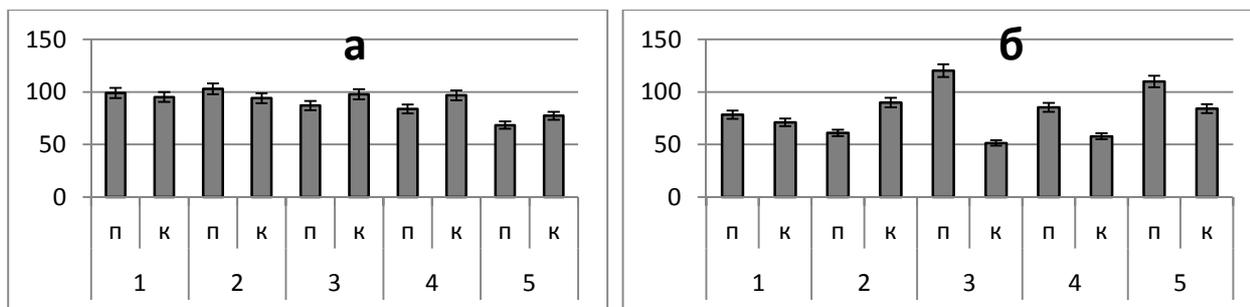


Рис. 2. Влияние предпосевной обработки потенциальными фунгицидными препаратами (1-5) на содержание перекиси водорода (а) и малонового диальдегида (б) в побегах и корнях проростков пшеницы (% от контроля) п – побег, к – корень. («Купробисан» - (1), «производное бисамина и тиомочевины» - (2), «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4), «1,3-аминосульфид» - (5).

Известно, что помимо сигнальных или иных функций АФК способны выполнять и негативную роль в организме растения. АФК способны повреждать белки, окисляя SH-группы, Fe-S-центры ферментов, фрагментируя пептидные цепи, повышая чувствительность к протеазам [9]. Такой продукт ПОЛ, как малоновый диальдегид (МДА), может быть использован как биологический индикатор развития окислительного стресса растений. АФК способны инициировать перекисное окисление липидов, в результате чего происходит повреждение клеточных мембран. Наши исследования выявили низкое содержание МДА под действием всех препаратов, за исключением высокого содержания МДА в побегах растений, выросших на фоне препаратов «Биодукс» - (3) и «1,3-аминосульфид» - (5), где были превышены значения контроля на 20.2 % и 10 %, соответственно (рис.2б). Низкое содержание МДА, видимо, связано с активацией антиоксидантной системы растения, а именно увеличением активности ферментов каталазы и пероксидазы. У растений, выросших на фоне препаратов «Купробисан» - (1), «производного бисамина и тиомочевины» - (2), «Бисол» - (4), значения МДА в побегах были ниже контроля на 21.6 % 38.8 %, 14.6 % соответственно. Так содержание МДА в корнях было ниже контроля под влиянием всех препаратов на 29 %, 10.1 %, 48.5 %, 42.2 % и 15.8 % соответственно. Таким образом, высокое содержание МДА в побегах растений, обработанных «Биодукс» - (3) и «1,3-аминосульфид» - (5), свидетельствуют о высокой скорости образования АФК, что, вероятно, является причиной интенсивного фотосинтеза и подтверждается высокими морфометрическими показателями растений (превышением длины побегов под влиянием препаратов «Биодукс» - (3) на 5% и «1,3-аминосульфид» - (5), на 14.5 % относительно контроля) (табл.1).

Под влиянием препаратов мы наблюдали высокий уровень активности фермента каталазы в побегах растений пшеницы выросших после замачивания семян препаратами «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4), «1,3-аминосульфид» - (5) (рис.3а). Причем уровень активности в побегах превышал «корневые» значения примерно в 2 раза. Противоположная картина

наблюдалась у растений выросших на фоне соединения «производного бисамина и тиомочевины» - (2) и препарата (1) - «Купробисан» активность фермента была выше в корнях, чем в побегах на 62.6-83.9 %.

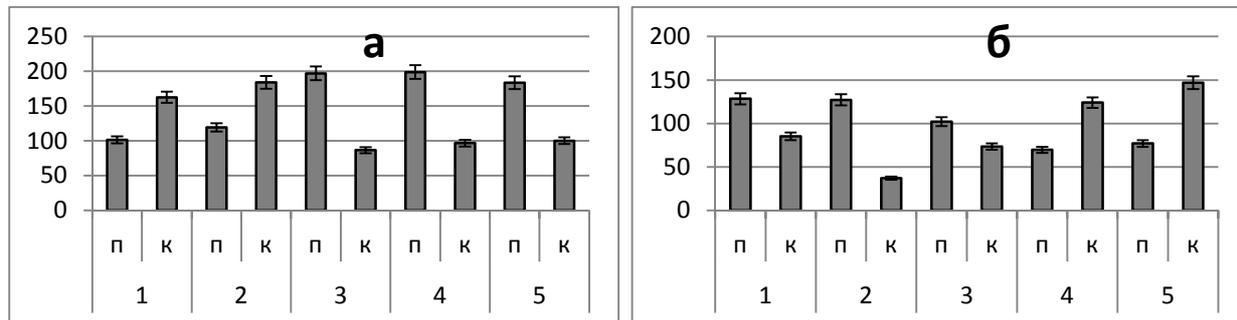


Рис.3 Влияние предпосевной обработки потенциальными фунгицидными препаратами (1-5) на активность фермента каталазы (а) и пероксидазы (б) в побегах и корнях проростков пшеницы (% от контроля). п – побег, к – корень. («Купробисан» - (1), «производное бисамина и тиомочевины» - (2), «Биодукс» - (3) «Бисол» - (4), «1,3-аминосульфид» - (5)).

Пероксидазы катализируют реакции восстановления перекиси водорода при участии различных субстратов. Гваяколовая пероксидаза присутствует в клеточных стенках и вакуолях, где восстанавливает перекись водорода за счет окисления фенольных соединений. Определение активности фермента гваякол-пероксидазы показало несколько иной характер изменений, так наибольшая активность фермента отмечалась в побеге у проростков, выросших на фоне препарата «Купробисан» - (1) и «производное бисамина и тиомочевины» - (2), что было на 30 % выше контроля (рис.3б). Причем активность данного фермента в корнях под действием препаратов (1) и (2) была ниже контроля на 14.9 % и 62.9 % соответственно.

### Заключение

Исследовано влияние потенциальных фунгицидных препаратов аминного ряда: 1,3 – аминоксульфида и производного бисамина и тиомочевины, а также выпускаемых промышленностью известных фунгицидных препаратов марок «Бисол», «Биодукс», «Купробисан» на окислительно-восстановительный обмен здоровых растений пшеницы. Вероятно установленная высокая скорость образования супероксид-аниона в проростках пшеницы, при предпосевной обработке «Бисолом» и 1,3 – аминоксульфидом, может быть связана с более активными ростовыми процессами, наблюдаемыми у проростков. Различный характер активности ферментов каталазы и пероксидазы в побегах и корнях проростков связан с разной степенью активации антиоксидантной системы при действии изучаемых препаратов. Таким образом, предпосевная обработка препаратами разных биологически активных химических соединений с фунгицидной активностью приводит к значительным изменениям в работе про-/антиоксидантной системы здоровых растений, в

функционировании системы образования и разрушения некоторых активных форм кислорода, в оценке эффективности её работы по накоплению продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) и в морфометрических показателях.

### Список литературы

1. Джемилев У.М., Ямалеев А.М., Шакирова Ф.М., Трошина Н.В., Яруллина Л.Г., Кудоярова Г.Р., Вахитов В. А., Селимов Ф. А. О механизме действия бисола-2 // Агрохимия. – 1990. – №9. – С.121-128.
2. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Окислительный стресс и состояние антиоксидантной системы в coleoptilyakh пшеницы при действии пероксида водорода и нагрева // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. – 2008. - Вып. 2(14). – С. 42-52.
3. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. – М.: Химия, 1987. – 712 с.
4. Ямалеева А.А., Хайруллина Р.Р., Набеева Р.А., Ямалеев А.М., Фархутдинов Р.Г., Ибрагимов А.И. Синтез 1,3-аминосульфидных комплексов, их биологическая эффективность к фитопатогенам, вызывающих корневые гнили и индуцирование реакции устойчивости у *Triticum aestivum* L. // Вестник Башкирского университета. – Том 20. – 2015. – N. 1. – С. 66-72.
5. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., Lorenzo G. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in *Tobacco* leaf explants // Plant Physiology, 2000, V. 122, P. 1379-1385.
6. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189-198.
7. Herbertte S., Lene C., de Iabrouhe D., Drevet J., Roedel-Drevet P. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors // Physiol. Plant. - 2003. - V. 119. - P. 418-428
8. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P. and Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // Protoplasma. 2001. V. 217, P. 125-128.
9. Montiller J.L., Cacas J.-L., Montane M.-H. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses // Plant J. - 2004. - V. 40. - P. 439-450.

10. Panchuk I.I., Volkov, R.A., and Schoffi, F. (2002) Heat stress-and heat shock transcription and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 838-853.

**Рецензенты:**

Иванов И.И., д.б.н., в.н.с. лаборатории физиологии растений Уфимского Института биологии РАН, г. Уфа;

Яруллина Л.Г., д.б.н., в.н.с. лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского Научного центра РАН, г. Уфа.