

Игорь Сергеевич Черепанов

Удмуртский государственный университет, доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии, кандидат химических наук, Россия, Ижевск

E-mail: cherchem@mail.ru

Полина Сергеевна Крюкова

Удмуртский государственный университет, магистрант кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии, Россия, Ижевск

E-mail: 79501763810@yandex.ru

БИОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГУМИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РАННИЕ СТАДИИ РОСТА *CUCUMIS SATIVUS* L. ПО ДАННЫМ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИИ

Цель исследования – ИК-Фурье спектроскопическое исследование динамики процессов образования первичных метаболитов в корневой системе проростков тест-растений *Cucumis Sativus* L., происходящих при их проращивании в растворах синтетических гуминоподобных продуктов. Решались задачи синтеза гуминоподобных продуктов на основе D-глюкозы и п-аминобензойной кислоты, проведения вегетационных экспериментов на тест-растениях (*Cucumis Sativus* L.) с добавками синтезированных продуктов и анализа ИК-Фурье спектров проростков посредством отнесения основных полос, характеризующих изменение содержания первичных метаболитов в корневой системе растений. Установлено, что водные растворы синтезированных продуктов оказывают заметное биостимулирующее действие на рост семян огурца (*Cucumis Sativus* L.) при низком содержании активного вещества (0,004–0,002 %), усиливающееся с уменьшением концентрации. Для 0,008 % раствора отмечено угнетение ростовых процессов в сравнении с контролем. Методом ИК-Фурье спектроскопии исследованы структурные изменения в корневой системе проростков тест-растения, происходящие при их проращивании в среде растворов синтезированных веществ. Спектр образца, пророщенного в 0,008 % растворе, показывает профиль полос, практически аналогичный спектру образца-контроля как по положению сигналов, так и по их интенсивности, которая для ряда ИК-полос оказывается даже ниже контроля. Спектры образцов, пророщенных в 0,004 и 0,002 % растворах, обнаруживают увеличение интенсивности полос при 1 240 см⁻¹ и особенно в области 960–1200 см⁻¹. Увеличение интенсивности ИК-полос связано с образованием соответствующих веществ, в частности процессами биосинтеза фосфорорганических соединений и аккумуляции углеводов. Исследованные продукты синтезируются из доступных и экологически безопасных биологически активных веществ, что в совокупности с их ростактивирующим действием и простотой получения делает перспективным дальнейшее изучение механизмов действия данных соединений на растительные системы с целью создания на их основе технологии производства эффективных препаратов для растениеводства.

Ключевые слова: гуминоподобные вещества, рострегулирующая активность, ИК-Фурье спектроскопия.

Igor S. Cherepanov

Udmurt State University, associate professor of the chair of fundamental and applied chemistry, candidate of chemical sciences, Russia, Izhevsk

E-mail: cherchem@mail.ru

Polina S. Kryukova

Udmurt State University, magistrate student of the chair of physiology, cellular biology and biotechnology, Russia, Izhevsk

E-mail: 79501763810@yandex.ru

BIOSTIMULATING INFLUENCE OF SYNTHETIC HUMIC-LIKE SUBSTANCES ON *CUCUMIS SATIVUS* L. EARLY STAGE GROWTH ACCORDING TO IR FOURIER TRANSFORM SPECTROSCOPY DATA

The research objective was IR-Fourier spectroscopic research of the dynamics of the processes of the formation of primary metabolites in root system of the sprouts of test plants of *Cucumis Sativus* L., occurring at their growing in the solutions of synthetic humic-like substances. The problems of synthesis of humic-like substances on the basis of D-glucose and p-aminobenzoic acid, carrying out vegetative experiments on test plants (*Cucumis Sativus* L. were solved.) with additives of the synthesized products and IR-Fourier's analysis of the ranges of sprouts by means of reference of the main strips characterizing the change of the maintenance of primary metabolites in root system of plants. In a series of laboratory experiments, it was found that aqueous solutions of synthesized products have noticeable biostimulating effect on the cucumber (*Cucumis Sativus* L.) seeds growth at low content of active substance (0.004–0.002 %), increasing with the concentration decrease. For 0.008 % solution, inhibition of growth processes was noted in comparison with control. Structural changes in the root system of the test plant seedlings occurred during their germination in the medium of solutions of synthesized substances were investigated using IR-Fourier transform spectroscopy method. The spectrum of the sample germinated in 0.008 % solution shows a band profile practically similar to the spectrum of the control sample both in terms of the position of the signals and their intensity, which for a number of IR bands is even lower than the control. The spectra of the samples germinated in 0.004 and 0.002 % solutions show an increase in band intensity at 1240 cm^{-1} and especially in the 960–1200 cm^{-1} region. The increase in the intensity of IR bands is associated with the formation of appropriate substances, in particular, the biosynthesis processes of organophosphorus compounds and also with stimulation the carbohydrates accumulation. The investigated products were synthesized from available and environmentally safe biologically active substances, which, together with their growth-activating action and simple preparation, made it promising to further study the activity mechanisms of these compounds on plant systems in order to create the production technology of effective preparations for plant industry on its basis.

Keywords: humic-like substances, growth regulating activity, IR Fourier transform spectroscopy.

Введение. В настоящее время биостимулирующие свойства гуминовых кислот и гуминоподобных веществ вызывают существенный интерес в области биохимии растений, при этом природа их действия на различных уровнях организации вещества изучена недостаточно. Достоверно установлено ауксиноподобное действие гуминовых веществ, связанное с освобождением гидрофильных компонентов их структуры, стимуляция роста корней растений обусловлена требованием наличия определенных кислород- и азотсодержащих функциональных групп [1]. Предложена и обоснована концепция адсорбционного связывания гуминовыми веществами ингибиторов развития семян, при этом показано, что биологическая активность гуматов обусловлена структурной организацией их первичных частиц [2].

Применение природных гуматов в качестве регуляторов роста связано с рядом ограничений, в частности с сохранением ими природного генезиса, низкой растворимостью в воде, узким интервалом действующих концентраций, недостаточной биологической активностью [3], а так-

же длительностью и трудоемкостью выделения препаратов из природного сырья, что предполагает актуальность разработки синтетических рострегулирующих составов, в том числе на основе продуктов сахар-аминных реакций [4].

Ранее нами были описан метод получения высокомолекулярных продуктов реакции Майяра (меланоидинов) в системе D-глюкоза – п-аминобензойная кислота [5], изучен структурно-групповой состав [6], при этом исследование природы их действия на процессы развития тест-растений (*Cucumis Sativus* L.) проведено не было. Другие авторы, изучавшие ростовые процессы корней огурца на ранних стадиях в присутствии гуминовых веществ и других регуляторов роста, не исследовали данную проблему [7], полезную информацию для решения которой можно получить с применением современных вариантов методов колебательной спектроскопии [8–10].

Цель исследования: ИК-Фурье спектроскопическое исследование динамики процессов образования первичных метаболитов в корневой системе проростков тест-растений *Cucumis Sativus* L.,

происходящих при их проращивании в растворах синтетических гуминоподобных продуктов.

В соответствии с поставленной целью решались **задачи** синтеза гуминоподобных продуктов на основе *D*-глюкозы и *n*-аминобензойной кислоты, проведения вегетационных экспериментов на тест-растениях (*Cucumis Sativus* L.) с добавками синтезированных продуктов и анализ ИК-Фурье спектров проростков посредством отнесения основных полос, характеризующих изменение содержания первичных метаболитов в корневой системе растений.

Материалы и методы исследования. Синтез целевых продуктов проводили в течение 2 ч по ранее предложенной методике [5], модифицированной использованием в качестве растворителя абсолютированного этанола фирмы Мерк. По окончании синтеза после удаления избытка растворителя твердый остаток промывался дистиллированной водой на стеклянных фильтрах до исчезновения поглощения фильтра при длине волны 465 нм. Водорастворимая фракция (проба фильтра объемом 25 мл) подвергалась диализу через целлофановые мембраны (10-кратный объем чистого растворителя (воды)) в течение 24 ч и использовалась в исходном и разбавленном до требуемой концентрации виде для биотестирования. Концентрации растворов предварительно установлены гравиметрически.

Продукты недиализуемой водорастворимой фракции выделялись в твердом виде в форме порошков коричневого цвета для контроля структурно-группового состава методом ИК-Фурье спектроскопии. Спектры снимались в режиме пропускания в таблетках KBr (Fluka, 1 : 200) на ИК-Фурье спектрометре ФСМ 2201 («Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия) в интервале волновых чисел 4000–500 см⁻¹ со спектральным разрешением по волновому числу 4 см⁻¹ при 60 сканах относительно воздуха, интенсивность полос определялась по методу базовой линии. Кратность измерений составляла не менее трех экспериментов.

Биотестирование полученных препаратов проводилось с использованием в качестве тест-растений семян огурца сорта Нежинский в трех параллелях. В чашки Петри, выложенные фильтровальной бумагой, полностью смоченной рабочими растворами, выкладывали по 10 семян и помещали в термостат. После четырех суток инкубации при 20 °С оценивалось количество нормально проросших семян и изменение длины корней в сравнении с контрольной пробой (дистиллированная вода). Для изучения характера действия синтезированных продуктов на ростовые процессы пробы (2 мг) корни проростков биотестируемых образцов семян высушивались, измельчались до однородной массы, таблетировались с KBr (1 : 300) и также исследовались ИК-Фурье спектроскопически [10].

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенное ранее изучение структурно-группового состава синтезированных водорастворимых недиализуемых продуктов показывает их близость к природным гуминовым веществам [6], что предполагает сходство в характере их биоактивности в лабораторных и вегетационных экспериментах. В данном исследовании по ИК-Фурье спектрам поглощения дополнительно проведена оценка индекса гидрофобности (HI) как отношения значения интегрального поглощения в областях 3000–2800 см⁻¹ (гидрофобная составляющая) к аналогичному значению в интервале 1720–1600 см⁻¹ (гидрофильная составляющая) [11–13]. Рассчитанное значение HI составило 1,18±0,02, что сопоставимо со значениями того же параметра, оцененного авторами [12] для различных по составу природных гуминовых веществ. Последнее имеет важное значение для сопоставления структурных параметров с эффектами изменения ростовых показателей.

Данные таблицы показывают, что с уменьшением содержания активного вещества в растворе ростстимулирующее действие возрастает.

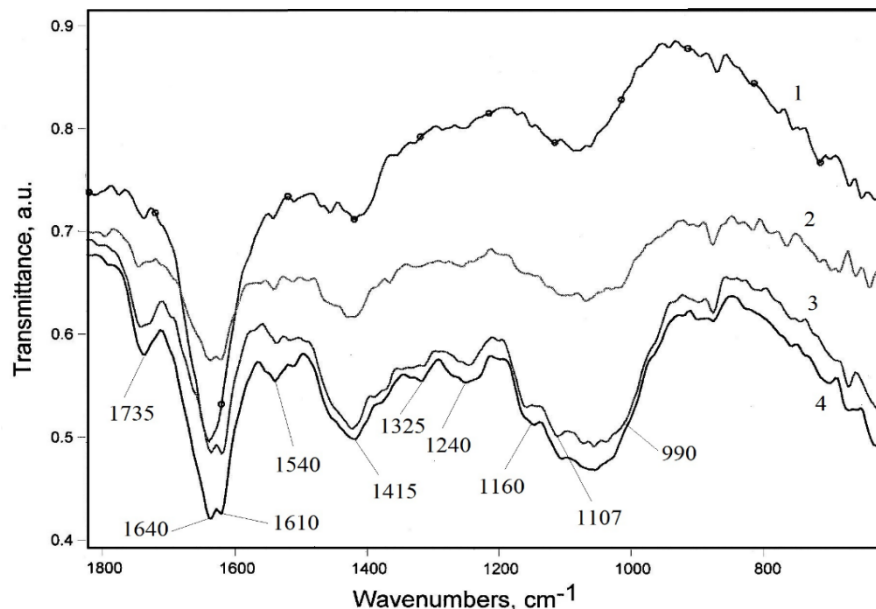
Влияние растворов синтезированных продуктов на ростовые характеристики семян огурца сорта Нежинский

Концентрация, %	Длина корня, см	Прирост, %	Всхожесть, %
Контроль	5,0 ± 0,2	–	62,5
0,008	4,7 ± 0,3	–9,0	70,8
0,004	5,5 ± 0,2	8,2	83,3
0,002	6,6 ± 0,2	22,7	85,0

Данный эффект является установленным для действия растворов природных гуминовых веществ на ростовые процессы [1, 14], что позволяет считать синтезированные продукты гуминоподобными и по характеру биологической активности.

Механизмы влияния синтетических регуляторов роста на развитие растений, как уже указыва-

лось, сложны и недостаточно изучены, тем не менее некоторую информацию о процессах роста могут также дать спектральные методы [5, 9, 11]. Спектры образцов корней тест-растения после вегетационных экспериментов приведены на рисунке.



Фрагменты ИК-Фурье спектров в диапазоне 1800–600 см⁻¹ корней проростков: 1 – контроль; 2 – после обработки раствором с концентрацией 0,008 %; 3 – после обработки раствором с концентрацией 0,004 %; 4 – после обработки раствором с концентрацией 0,002 %

Присутствие сложноэфирных фрагментов (пектиновые полисахариды и липиды клеток) подтверждается наличием полосы 1735 см⁻¹ ($\nu_{C=O}$), полоса 1665 см⁻¹ может быть отнесена к колебаниям гликозидных фрагментов полисахаридов (ν^{as}_{C-O-C}). Белковая составляющая структуры представлена полосами амид I и амид II в интервале 1520–1650 см⁻¹ ($\nu_{C=O}$, $\delta_{NH} + \nu_{CN}$); эта же область отвечает колебаниям ионизированных кислотных групп пектина ($\nu^{as}_{COO^-}$) и ароматических лигниновых систем ($\nu_{C=C}$) [11]. Широкая полоса в интервале 1460–1380 см⁻¹ характерна для алифатических и алициклических лигнина и полисахаридов (δ_{CH}), а также функциональных групп пектина (δ_{OH} , $\nu^{s}_{COO^-}$). Размытый сигнал при 1240 см⁻¹ относится к асимметричным валентным колебаниям P=O ($\nu^{as}_{PO_2}$) нуклеиновых кислот с вкладом полос амид III (ν_{CN}) и ν_{C-O} карбоксильных групп, тогда как 1107 см⁻¹ – к колебаниям $\nu_{CO} + \nu_{CC}$ связей пектинов [9, 11]. Со-

ставная полоса в области 1000–1100 см⁻¹, характеризующая наличие фрагментов гемицеллюлоз и нуклеотидов ($\nu_{CCO} + \nu_{CO} + \nu_{CC} + \delta_{OH}$, $\nu^{s}_{PO_2}$), имеет на низкочастотном крыле плечо 980–1000 см⁻¹, относимое к колебаниям P-O в P(=O)OH и POH фрагментах [15]. Полосы в области ниже 950 см⁻¹ малоинтенсивны и отвечают деформационным колебаниям C-H в ароматических структурах (ν_{C-H}), а также скелетным колебаниям углеводных колец.

Сопоставление спектров 3 и 4 со спектром контрольного опыта 1 показывает увеличение интенсивности ряда полос. В частности, с уменьшением концентрации растворов и усилением стимуляции роста увеличивается интенсивность карбонильной полосы 1735 см⁻¹, связанная с аккумуляцией пектинов клеточных стенок [8]. Также начинает отчетливо проявляться полоса при 1325 см⁻¹, относимая к сложным колебаниям циклических углеводных фрагментов с

вкладом ν_{C-O} [11], аналогичный эффект наблюдается для полосы около 1240 см^{-1} . Кроме того, фиксируется увеличение интенсивности широкого сигнала в области $960\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ с максимумом при 1067 см^{-1} , что может быть связано с углеводной (целлюлоз-гемицеллюлозной) конверсией [11]. При этом спектр 2, отвечающий проращиванию семян в $0,008\%$ растворе, показывает профиль полос, практически аналогичный контрольному спектру как по положению сигналов, так и по их интенсивности (интенсивность полосы в области $1600\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ оказывается даже ниже контроля). Подобные изменения согласуются с данными экспериментов по проращиванию (см. табл.), когда для $0,004$ и $0,002\%$ растворов наблюдается рост, тогда как для $0,008\%$ – угнетение. Можно предположить, что увеличение интенсивности ИК-полос связано с образованием соответствующих веществ [10], в частности процессами биосинтеза фосфорорганических соединений, что характерно для действия природных гуматов и стимуляции образования углеводов [1].

Выводы. Лабораторные эксперименты по проращиванию семян тест-растения сорта Нержинский в растворах синтезированных продуктов показывают увеличение их ростстимулирующей активности с уменьшением концентрации, что указывает на гуминоподобную природу их биоактивности. Анализ ИК-Фурье спектров корней проростков свидетельствует об активации процессов синтеза фосфорорганических соединений и увеличения углеводного пула на ранних стадиях роста. Исследованные продукты синтезируются из доступных и экологически безопасных биологически активных веществ (*D*-глюкоза, *n*-аминобензойной кислоты), что в совокупности с их ростактивирующим действием и простотой получения делает перспективным дальнейшее изучение механизмов действия данных соединений на растительные системы с целью создания на их основе технологии производства эффективных и экологичных препаратов для растениеводства.

Литература

1. Кондратенко Е.П. и др. Биостимулирующие и физико-химические свойства гумата натрия // Химия растительного сырья. 2016. № 3. С. 109–118.
2. Федотов Г.Н. и др. Уточнение представлений о биологической активности гуминовых препаратов // Лесной вестник. 2018. Т. 22, № 1. С. 36–42.
3. Швыжкин А.Ю. и др. Химическая модификация гуминовых кислот торфа природными и синтетическими регуляторами роста растений и биологическая активность полученных препаратов // Агрехимия. 2017. № 6. С. 45–51.
4. Light M., Burger B., van Staden J. Formation of seed germination promoter from carbohydrates and aminoacids // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53. P. 5936–5942. DOI: 10.1021/jf050710u.
5. Черепанов И.С., Сергеева К.А. Процессы меланоидинообразования в этанольных системах моносахарид – ариламин – медь (II) // Вестник МГТУ. 2017. Т. 20, № 3. С. 526–532.
6. Черепанов И.С., Крюкова П.С. Применение спектроскопии для изучения медьиндуцированных изменений растений огурца (*Cucumis Sativus* L.) // Проблемы агрохимии и экологии. 2020. № 2. С. 48–51.
7. Rauthan B, Schnitzer M. Effect of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis Sativus*) plants // Plant and Soil. 1981. Vol. 63. P. 491–495.
8. Buensanteai N., Sompong M., Saengchan C., Thumanu K. The cellular components of cucumber seedlings after primed with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* Bs008 // Afr. J. Microbiol. Res. 2014. Vol. 8. P. 1006–1011. DOI: 10.5897/AJMR12.1856.
9. D'Souza L., Devi P., Shridhar M., Naik C. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to study cadmium-induced changes in *Padina Tetrastromatica* (Hauck) // Analit. Chem. Insight. 2008. Vol. 3. P. 135–143.
10. Nikajie G., Kumar J., Nikam T., Suprasanna P. FT-IR profiling reveals differential response of roots and leaves to salt stress in a halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. // Biotech. Reports. 2019. Vol. 23. P.e00352. DOI: 10.1016/j.brre.2019.e00352.
11. Wu J., Guo J., Hu Y. Gong H. Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress // Front. Plant Sci. 2015. Vol. 6. P. 453. DOI: 10.3389/fpls.2015.00453.
12. Canellas L., Dobbss L., Olevreira A., Chagas J., Aguiar N., Rumjanek V. et al. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots // Eur. J. Soil. Sci. 2012. Vol.

63. P. 315–324. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2012.01439.x.
13. *Matejkova S., Simon T.* Application of FTIR spectroscopy for evaluation of hydrophobic/hydrophilic organic components in arable soil // *Plant Soil. Environ.* 2012. Vol. 58. P. 192–195.
 14. *Куприна М.Н., Колесникова В.Л.* Использование стимуляторов роста на основе торфа в ягодном питомнике // *Вестник КрасГАУ.* 2014. № 7. С. 85–91.
 15. *Puziy A., Poddubnaya O., Martinez-Alonso A., Suarez-Garcia F., Tascon J.* Synthetic carbons activated with phosphoric acid: I. Surface chemistry and ion binding properties // *Carbon.* 2002. Vol. 40. P. 1493–1505.
 8. *Buensanteai N., Sompong M., Saengchan C., Thumanu K.* The cellular components of cucumber seedlings after primed with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* Bs008 // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2014. Vol. 8. P. 1006–1011. DOI: 10.5897/AJMR12.1856.
 9. *D'Souza L., Devi P., Shridhar M., Naik C.* Use of Fourier transform infrared spectroscopy to study cadmium-induced changes in *Padina Tetrastrumatica* (Hauck) // *Analit. Chem. Insight.* 2008. Vol. 3. P. 135–143.
 10. *Nikajie G., Kumar J., Nikam T., Suprasanna P.* FT-IR profiling reveals differential response of roots and leaves to salt stress in a halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. // *Biotech. Reports.* 2019. Vol. 23. P.e00352. DOI: 10.1016/j.brre.2019.e00352.
 11. *Wu J., Guo J., Hu Y. Gong H.* Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress // *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 6. P. 453. DOI: 10.3389/fpls.2015.00453.
 12. *Canellas L., Dobbss L., Oleveira A., Chagas J., Aguiar N., Rumjanek V.* et al. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots // *Eur. J. Soil. Sci.* 2012. Vol. 63. P. 315–324. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2012.01439.x.
 13. *Matejkova S., Simon T.* Application of FTIR spectroscopy for evaluation of hydrophobic/hydrophilic organic components in arable soil // *Plant Soil. Environ.* 2012. Vol. 58. P. 192–195.
 14. *Kuprina M.N., Kolesnikova V.L.* Ispol'zovanie stimulyatorov rosta na osnove torfa v jagodnom pitomnike // *Vestnik KrasGAU.* 2014. № 7. С. 85–91.
 15. *Puziy A., Poddubnaya O., Martinez-Alonso A., Suarez-Garcia F., Tascon J.* Synthetic carbons activated with phosphoric acid: I. Surface chemistry and ion binding properties // *Carbon.* 2002. Vol. 40. P. 1493–1505.

Literatura

1. *Kondratenko E.P.* i dr. Biostimulirujushhie i fiziko-himicheskie svojstva gumata natrija // *Himija rastitel'nogo syr'ja.* 2016. № 3. S. 109–118.
2. *Fedotov G.N.* i dr. Utochnenie predstavlenij o biologicheskoy aktivnosti guminovykh preparatov // *Lesnoj vestnik.* 2018. T. 22, № 1. S. 36–42.
3. *Shvykin A.Ju.* i dr. Himicheskaja modifikacija guminovykh kislot torfa prirodnyimi i sinteticheskimi reguljatorami rosta rastenij i biologicheskaja aktivnost' poluchennykh preparatov // *Agrohimiya.* 2017. № 6. S. 45–51.
4. *Light M., Burger B., van Staden J.* Formation of seed germination promoter from carbohydrates and aminoacids // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. P. 5936–5942. DOI: 10.1021/jf050710u.
5. *Cherepanov I.S., Sergeeva K.A.* Processy melanoidinoobrazovanija v jetanol'nyh sistemah monosaharid – arilamin – med' (II) // *Vestnik MGTU.* 2017. T. 20, № 3. S. 526–532.
6. *Cherepanov I.S., Krjukova P.S.* Primenenie spektroskopii dlja izuchenija med'inducirovannykh izmenenij rastenij ogurca (*Cucumis Sativus* L.) // *Problemy agrohimii i jekologii.* 2020. № 2. S. 48–51.
7. *Rauthan B, Schnitzer M.* Effect of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cu-