

На правах рукописи



КАЗАНЦЕВА ВАРВАРА ВИКТОРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В
РАСТЕНИЯХ ГРЕЧИХИ (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) В НОРМЕ И В
УСЛОВИЯХ СТРЕССА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в группе фенольного метаболизма растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Загоскина Наталья Викторовна

кандидат биологических наук

Гончарук Евгения Александровна

Официальные оппоненты:

Соловьев Александр Александрович

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Кособрюхов Анатолий Александрович

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «22» сентября 2020 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Фенольные соединения или полифенолы являются одними из наиболее распространенных вторичных метаболитов высших растений, образующихся во всех их клетках и тканях (Запрометов, 1993; Вольнец, 2013; Cheynier et al., 2013; Alscher, Hess, 2017). Структура полифенолов чрезвычайно разнообразна, как и выполняемые ими функции. Известно, что они придают окраску цветкам, плодам и семенам, участвуют в регуляции роста и развития растений, являются хелаторами тяжелых металлов, регулируют экспрессию некоторых генов и защищают растения от стрессовых воздействий (Harborne, 1997; Bidel et al., 2010; Mierziak et al., 2014; Naikoo et al., 2019). Фенольные соединения имеют важное практическое значение. Они используются в различных отраслях пищевой промышленности, а также в медицине - в качестве ценных лекарственных препаратов широкого спектра действия (Тараховский и др., 2013; Rio et al., 2010; Tungmunnithum et al., 2018).

В настоящее время хорошо изучены структура фенольных соединений, биосинтез и гены, ответственные за их образование (Cheynier et al., 2013; Saltveit, 2017; Matsui, Walker, 2020). Тем не менее, до сих пор данные о роли этих представителей вторичного метаболизма в жизни растений остаются еще неполными и достаточно противоречивыми, что связано с исключительным их разнообразием. Мало известно и об образовании фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений, в том числе в условиях действия неблагоприятных факторов внешней среды (Koyama et al., 2013; Verma, Shukla, 2015). Исследование этой проблемы имеет важное значение, особенно для гречихи посевной или обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* Moench), которая широко востребована как в сельском хозяйстве, так и в различных отраслях пищевой и фармацевтической промышленности (Куркин, 2007; Клыков, 2010; Holasova et al., 2002; Kreft, 2016). Одной из важных ее характеристик является значительное накопление фенольных соединений, в том числе рутина – вещества с высокой антиоксидантной активностью (Высочина, 2004; Ganeshpurkar, Saluja, 2017). Несмотря на давний и постоянный интерес исследователей к этой культуре сведения об образовании различных полифенолов в условиях действия стрессовых факторов на начальных этапах ее роста немногочисленны (Маргна, 1990; Полехина, Павловская 2013; Koyama et al., 2013).

Гречиха посевная представлена как диплоидными, так и тетраплоидными формами, которые отличаются своей продуктивностью и онтогенетическим развитием (Анохина и др., 2011; Кадырова и др., 2013; Betekhtin et al., 2018). Это может быть следствием возрастания дозы гена при полиплоидизации растительных клеток, что влияет на развитие растений и их метаболизм (Eng, Ho, 2019). Однако до сих пор остается малоисследованным вопрос о способности растений гречихи с различным уровнем ploидности к накоплению фенольных соединений на ранних стадиях онтогенеза.

Цель исследования: изучить особенности образования различных классов фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) в норме и при действии стрессовых (рост-ингибирующих) факторов (тяжелые металлы, низкие положительные температуры).

В соответствии с данной целью были поставлены следующие **задачи:**

1. Сравнить содержание фенольных соединений, в том числе фенилпропаноидов и флавоноидов, в надземных органах проростков различных сортов гречихи.
2. Исследовать динамику накопления различных классов фенольных соединений и активность *L*-фенилаланинаммиаклиазы в надземных органах проростков диплоидного и тетраплоидного генотипов гречихи.
3. Изучить влияние кадмия на морфофизиологические характеристики проростков двух контрастных по ploидности генотипов гречихи, образование фенольных соединений и активность *L*-фенилаланинаммиаклиазы в их надземных органах.

4. Исследовать влияние низкой положительной температуры на морфофизиологические характеристики, образование фенольных соединений и активность *L*-фенилаланинаммиакилазы в надземных органах проростков двух генотипов гречихи.
5. Изучить состав фенольного комплекса надземных органах проростков двух генотипов гречихи в норме и при действии стрессовых факторов (кадмий, низкая температура).

Научная новизна. Впервые проведено сравнение содержания основных классов фенольных соединений гречихи посевной (*F. Esculentum* Moench), в том числе фенилпропаноидов и флавоноидов, у проростков 10 разных сортов, внесенных в Госреестр России. Показан достаточно близкий их уровень в надземных органах, за исключением сорта Башкирская красностебельная, обладающего более высокой биосинтетической способностью. Выявлены схожие тенденции в накоплении этих вторичных метаболитов на начальных этапах онтогенеза диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи. Показано снижение роста проростков в присутствии кадмия (Cd), который преимущественно накапливался в корнях, а также отличия в содержании полифенолов в надземных органах ДГГ и ТГГ. Впервые установлено, что проростки контрастные по плоидности имеют отличающийся ответ растительных клеток на действие гипотермии, что выражалось в различиях характера изменений активности ФАЛ, а также в преимущественном снижении содержания изучаемых вторичных метаболитов у ДГГ и отсутствии изменений в накоплении ФС у ТГГ. Приоритетом работы является использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для сравнения состава и содержания основных соединений фенольного комплекса надземных органов проростков двух контрастных по плоидности генотипов гречихи, выращиваемых в стандартных условиях и при действии стрессовых факторов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные имеют фундаментальный характер и свидетельствуют об особенностях образования фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с высокой способностью к их накоплению, в частности гречихи посевной (*F. Esculentum* Moench). Результаты исследования важны для понимания физиологических реакций фенол-продуцирующих растений, в том числе с различным уровнем плоидности (2n и 4n), на стрессовое воздействие. Экспериментальные данные расширяют знания о фенольном метаболизме растений. Результаты работы по влиянию стрессовых факторов на начальные этапы онтогенеза двух генотипов гречихи, важны при разработке технологий выращивания этой культуры в регионах с неблагоприятными природно-климатическими условиями. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов биологических, экологических и сельскохозяйственных специальностей.

Методология и методы исследования. При выполнении работы применялись современные физиологические и биохимические методы, ранее прошедшие апробацию. Эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах.

Публикации и апробация работы на научных мероприятиях. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из которых 2 – в изданиях, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России.

Результаты диссертационной работы были представлены на Международной научной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), IX и X Международных симпозиумах «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015 и 2018), Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), межинститутском научном молодежном семинаре ИФР РАН «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2016), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2017»

(Москва, 2017), XIII Международной научной конференции "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования" (Сочи, 2018), V Международной научно-методической конференции «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений» (Москва, 2019).

Связь с научными программами. Работа выполнялась с 2013-2019 гг. в группе фенольного метаболизма растений ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук в рамках темы НИР «Регуляция образования фенольных соединений в высших растениях при действии экзогенных веществ и стрессовых факторов» (№ 0106-2018-0008), а также при частичной поддержке гранта РФФИ № 14-04-01742.

Личный вклад автора в исследование. Автор работы принимал непосредственное участие в организации, планировании и проведении экспериментов, в обсуждении результатов и подготовке рукописей к публикации. Результаты получены лично автором или при его активном участии.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 179 машинописного текста, содержит 13 таблиц, 52 рисунка и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследований, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы. Список литературы включает 372 наименования из них 228 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. Объектами исследования были проростки 10 сортов гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench), включенных в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации. Сорта Девятка, Диалог, Дизайн, Дикуль, Темп, Башкирская красно-стебельная, Батыр, Чатыр-Тау, Илишевская – диплоидные культуры ($2n=16$) из коллекции ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (Орел, Россия), а сорт Большевик 4 имел тетраплоидный набор хромосом ($4n=32$) и был получен из коллекции Кропотовской биостанции Института биологии развития им. Кольцова РАН (Москва, Россия). Большинство исследований было проведено на проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи (сорта Девятка и Большевик 4, соответственно).

В зависимости от цели экспериментов использовали проростки гречихи различного возраста, которые выращивали методом рулонной культуры на воде или на водных растворах, содержащих $Cd(NO_3)_2$ в концентрациях 32 мкМ, 65 мкМ, 97 мкМ (изучение действия кадмия: варианты I-III, соответственно;) в камерах фитотрона ИФР РАН в условиях 16-час. фотопериода (5000 люкс) при $+24^\circ C$ или $+5^\circ C$ (изучения действия гипотермии).

Для биохимических исследований использовали замороженные жидким азотом надземные органы проростков (гипокотили, семядольные листья), которые хранили в холодильнике при $-70^\circ C$ до проведения определений.

Морфофизиологическое состояние проростков оценивали по длине корня и гипокотилия. Определяли сырую массу корня, гипокотилия и семядольных листьев весовым методом.

Оводненность растительных тканей определяли после их высушивания до постоянного веса при $+70^\circ C$ (Рогожин, Рогожина, 2013).

Содержание кадмия (Cd) анализировали в высушенных до постоянного веса ($70^\circ C$) корнях, гипокотилиях и семядольных листьях проростков. Корни предварительно обрабатывали 10 мМ ЭДТА (10 мин) и промывали дистиллированной водой (Серегин и др., 2015). Сухой растительный материал минерализовали в растворах концентрированных HNO_3 и $HClO_4$ (2:1 v/v) в течение 24 ч при $25^\circ C$, после чего инкубировали в термостате TDB-A-400 при $150^\circ C$ и $180^\circ C$ (Голубкина, 1995). Аналогичную процедуру проводили с фильтровальной бумагой, используемой при рулонном способе выращивания проростков, для определения адсорбции на ней металла. Содержание Cd определяли на атомно-абсорбционном

спектрофотометре Формула ФМ-400 ("ЛабИст", Россия) с применением ламп с полым катодом (Hamamatsu Photonics, Japan).

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в надземных органах проростков определяли общепринятым методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Жиров и др., 1982; Лукаткин, Голованова, 1988).

Фенольные соединения (ФС) извлекали из надземных органов проростков 96%-ным этанолом (Олениченко, Загоскина, 2005). Содержание суммы ФС определяли с реактивом Фолина-Дениса (Запрометов, 1971), содержание флавоноидов – с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия (Gage, Wendel, 1950), содержание фенилпропаноидов – методом прямого спектрофотометрирования (Куркин, Вельямкина, 2011). Содержание суммы ФС и содержание флавоноидов выражали в мг-экв. рутина/г сухой массы, содержание фенилпропаноидов – в мг-экв. кофейной кислоты/г сухой массы.

Антоцианы извлекали из гипокотилей проростков 3%-ным раствором HCl в 96%-ном этаноле и определяли их содержание методом прямого спектрофотометрирования (Ратькин и др., 1980). Содержание антоцианов выражали в мг-экв. цианидина/г сухой массы.

Активность L-фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ) определяли ранее описанным методом (Олениченко, Загоскина, 2005). Для выделения фермента использовали Na-боратный буфер (рН 8,8), содержащий ЭДТА (0,5 мМ), дитиотреитол (3 мМ) и поливинилпирролидон. Активность ФАЛ определяли в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогената при 14000 об./мин, оценивая образование *транс*-коричной кислоты из L-фенилаланина при 290 нм (Zucker, 1965).

Количество белка в экстрактах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Определение состава и содержания фенольных веществ проводили в этанольных экстрактах надземных органов проростков методом ВЭЖХ: хроматограф фирмы Agilent Technologies (модель 1100), укомплектованный проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-х канальным насосом градиента низкого давления G1311A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодноматричным детектором G1316A, флуоресцентным детектором G1315B. Для разделения веществ применяли хроматографическую колонку «ZORBAX» SB-C18 размером $\times 150 \mu\text{m}$. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Состав элюента: раствор А – метанол, раствор В – 0,6%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты. Хроматограммы регистрировали при 280 нм и 350 нм. Идентификацию веществ производили путем сравнения их спектральных характеристик и времени удерживания с аналогичными характеристиками стандартов. Спектральные характеристики отдельных веществ получали с использованием данных литературы (Зайцев и др., 2014; Woodring et al., 1990; Bagchi et al., 2003).

Статистический анализ. В экспериментах использовали трехкратные биологические и двукратные аналитические повторности измерений. Для дисперсионного анализа (ANOVA) применяли программу Sigma Plot 12.3. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по тесту Тьюки при $p < 0,050$. Статистически достоверные различия между контролем и опытом отмечены разными буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение содержания различных классов фенольных соединений в проростках различных сортов *Fagopyrum esculentum*

Изучение морфофизиологических характеристик проростков десяти сортов гречихи, выращенных в течение 14 сут методом рулонной культуры в стандартных условиях (вода, +24°C, 16-час. фотопериод), показало достаточно близкие показатели их высоты, веса и

оводненности надземных органов (данные представлены в диссертации). Это свидетельствует о значительном сходстве начальных этапов онтогенеза этих растений.

Определение содержания фенольных соединений в органах и тканях растений часто рассматривают как критерий их потенциальной устойчивости к стрессовым воздействиям (Agati et al., 2012). Однако исследований о накоплении различных классов фенольных соединений в надземных органах (гипокотили, семядольные листья) проростков гречихи крайне мало.

В *гипокотилиях проростков* гречихи наибольшее суммарное содержание фенольных соединений, как показатель биосинтетической способности к накоплению данных вторичных метаболитов, было у сорта Башкирская красностебельная (рис. 1). Оно на 45-65% превышало таковое других вариантов. В гипокотилиях других вариантов оно было ниже, чем у сорта Башкирская красностебельная: на 46% у сортов Девятка, Илишевская, Чатыр тау), на 58% – у сортов Дикуль, Диалог, Дизайн, Темп и на 65% – у Большевик 4 и Батыр.

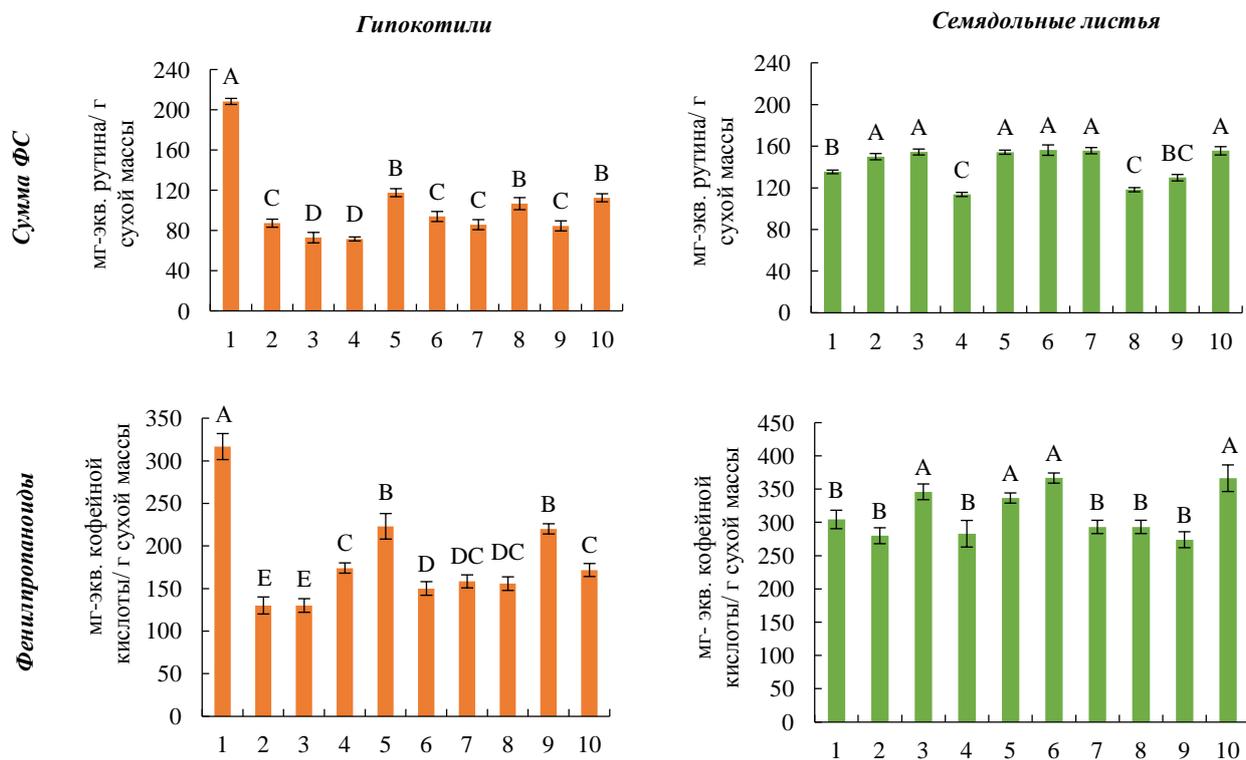


Рис. 1. Содержание суммы фенольных соединений (ФС) и фенилпропаноидов в гипокотилиях и семядольных листьях проростков различных сортов *Fagopyrum esculentum*.

1– Башкирская красностебельная; 2– Дикуль; 3 – Большевик 4; 4 – Батыр; 5 – Девятка; 6 – Диалог; 7 – Дизайн; 8– Илишевская; 9 – Темп; 10 – Чатыр тау.

Фенилпропаноиды представляют собой биогенетически ранние вещества фенольного метаболизма, которые могут накапливаться в растительных тканях или вовлекаться в биосинтез флавоноидов (Запрометов, 1974; Muro-Villanueva et al., 2019). Наибольшее их содержание было в гипокотилиях проростков сорта Башкирская красностебельная (см. рис. 1). В остальных вариантах оно было ниже: у сортов Девятка и Темп – на 30%, у Батыр и Чатыр тау – на 46%, у Диалог, Дизайн и Илишевская – на 50%, у Дикуль и Большевик 4 – на 59%.

Антоцианы в растениях гречихи накапливаются преимущественно у основания стебля и в гипокотилиях проростков, придавая им ярко розовую окраску (Якименко, 1982). Наибольшее их количество было у сорта Башкирская красностебельная (рис. 2).

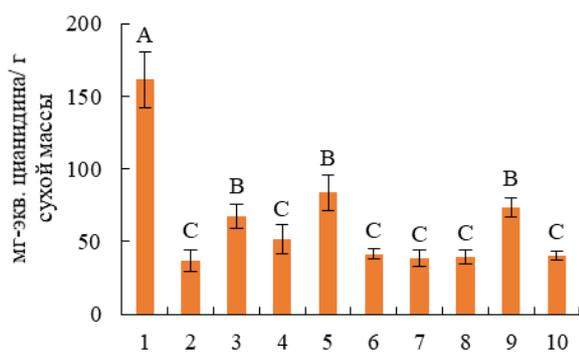


Рис. 2. Содержание антоцианов в hypocотилиях проростков различных сортов *Fagopyrum esculentum*. 1– Башкирская красностебельная; 2– Дикуль; 3– Большевик 4; 4– Батыр; 5– Девятка; 6– Диалог; 7– Дизайн; 8– Илишевская; 9– Темп; 10– Чатыр тау.

В hypocотилиях проростков остальных сортов гречихи оно было ниже: на 50% у Большевик 4, Девятка, Темп; на 70-80% – у Батыр, Диалог, Чатыр тау, Илишевская, Дизайн, Дикуль. Полученные данные еще раз подтверждают «уникальность» гречихи сорта Башкирская красностебельная в отношении накопления антоцианов.

Семядольные листья проростков различных сортов гречихи в большинстве случаев содержали в 1,5-2 раза больше фенольных соединений по сравнению с hypocотилиями, за исключением сорта Башкирская красностебельная (см. рис. 1). Эти различия могут быть следствием функционирования в них хлоропластов – одного из основных мест биосинтеза этих вторичных метаболитов (Запрометов, Николаева, 2003; Agati et al., 2012).

Содержание суммы фенольных соединений было наибольшим и равным в семядольных листьях проростков сортов Дикуль, Большевик 4, Девятка, Диалог, Дизайн и Чатыр тау. У сортов Башкирская красностебельная и Темп отмечен более низкий их уровень (на 12%), также как у сортов Батыр и Илишевская (на 30%).

Количество *фенилпропаноидов* в семядольных листьях было выше, чем в hypocотилиях (в 1,5-2 раза), что отмечалось и для суммы фенольных соединений. Исключением являлись проростки сорта Башкирская красностебельная, у которых количество фенилпропаноидов в hypocотилиях и семядольных листьях было практически равным. При этом в семядольных листьях проростков различных сортов гречихи столь ярко выраженных различий в содержании фенилпропаноидов, как в случае hypocотилей, не наблюдалось. Более высокий их уровень отмечен у сортов Большевик 4, Девятка, Диалог, Чатыр тау, который в среднем на 23% превышал таковой семядольных листьев других сортов.

Флавоноиды являются основными компонентами фенольного комплекса листьев гречихи (Высочина, 2004; Gupta et al, 2011). Наибольший и практически одинаковый их уровень отмечен в семядольных листьях сортов Башкирская красностебельная, Большевик 4 и Диалог (рис.3).

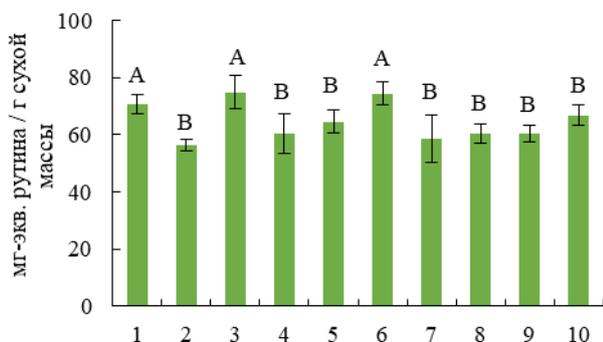


Рис. 3. Содержание флавоноидов в семядольных листьях проростков различных сортов *Fagopyrum esculentum*.

1– Башкирская красностебельная; 2– Дикуль; 3– Большевик 4; 4– Батыр; 5– Девятка; 6– Диалог; 7– Дизайн; 8– Илишевская; 9– Темп; 10– Чатыр тау.

Таким образом, накопление фенольных соединений было самым высоким в проростках гречихи сорта Башкирская красностебельная, что является следствием его селекции, направленной на получение культуры с высокой способностью к биосинтезу фенольных соединений (Сабитов и др., 2010). Остальные исследованные сорта гречихи условно можно разделить на три группы: с более высокой (Темп, Девятка, Чатыр тау),

средней (Дикуль, Большевик 4, Диалог) и более низкой (Батыр, Илишевская, Дизайн) способностью к накоплению фенольных соединений относительно сорта Башкирская красностебельная.

2. Начальные этапы онтогенеза двух контрастных по плоидности генотипов *Fagopyrum esculentum*: содержание фенольных соединений, активность L-фенилаланинаммиаклиазы

Исследование морфофизиологических характеристик (линейные размеры, вес, оводненность) надземных органов проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи (сорта Девятка и Большевик 4; соответственно) показало их значительное сходство на начальных этапах онтогенеза (6-19 сут; данные представлены в диссертации). Можно отметить тенденцию к более быстрому росту ДГГ по сравнению с ТГГ, что имеет важное значение при переходе растений от гетеротрофного к автотрофному типу питания и последующей адаптации растений к экологическим условиям окружающей среды (Амелин и др., 2013).

Содержание фенольных соединений. Определение суммарного содержания фенольных соединений в hypocotyls проростков двух генотипов гречихи показало одинаковые тенденции этого процесса на начальных этапах онтогенеза, хотя их уровень у ТГГ был выше по сравнению с ДГГ (рис. 4). С 6-х по 11-е сут роста их количество возрастало (у ДГГ и ТГГ на 38% и 48%, соответственно), а к 19 сут- резко снижалось (в 4 у ДГГ и в 2 раза у ТГГ). Исходя из этих данных можно заключить, что максимальное накопление фенольных соединений в hypocotyls отмечалось на 11 сут, что соответствует фенологической фазе «всходов», а минимальное – на 19 сут, что соответствует фенологической фазе «первая пара настоящих листьев» (Зотиков, 2009). Это еще раз подтверждает факт «зависимости» фенольного метаболизма от стадии онтогенеза и генотипа растений (Волынец, 2013; Saltveit, 2017).

В семядольных листьях проростков гречихи суммарное содержание фенольных соединений всегда было выше, чем в hypocotyls (на 22-86% в зависимости возраста проростков). К 11 сут роста оно повышалось (почти на 100% у ДГГ и на 37% у ТГГ) и в дальнейшем сохранялось на этом уровне (рис. 4).

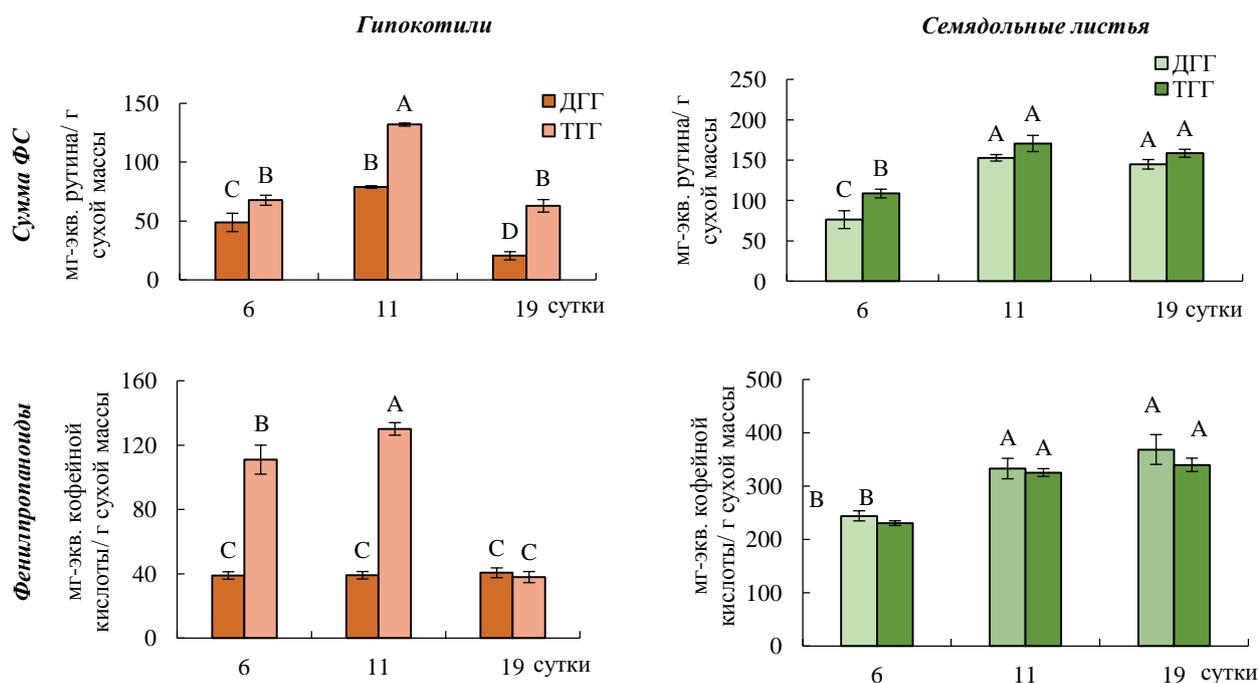


Рис. 4. Изменения в содержании суммы фенольных соединений (ФС) и фенилпропаноидов в проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum* по мере их роста.

Содержание *фенилпропаноидов* в hypocotylax ТГГ на начальных этапах роста проростков гречихи (6 и 11 сут) значительно превышало таковое ТГГ, тогда как на 19 сут их уровень был одинаковым (рис. 4). При этом у ДГГ их уровень в течение всего периода исследования не изменялся, тогда как у ТГГ он незначительно повышался с 6-х по 11 сут роста (на 14%), а затем (19 сут) резко снижался (на 70%).

В семядольных листьях проростков обоих генотипов гречихи содержание фенилпропаноидов было значительно выше, чем в hypocotylax (на 88% у ДГГ и 55-88% у ТГГ). Наименьший их уровень отмечен в самом начале роста проростков (6 сут). К 11 сут он повышался в равной степени у ДГГ и ТГГ (на 26-29%). К 19 сут достоверных изменений в содержании фенилпропаноидов в семядольных листьях проростков не отмечалось.

Количество *антоцианов* в hypocotylax ДГГ было достаточно «стабильным» в течение всего периода исследования, хотя прослеживалась тенденция к их накоплению по мере роста проростков гречихи (рис.5). В hypocotylax ТГГ оно резко увеличивалось с 6-х по 11-е сутки роста (почти на 70%) и достоверно не изменялось в дальнейшем (19-е сут). В целом для ТГГ характерна более высокая способность к образованию антоцианов по сравнению с ДГГ.

Содержание *флавоноидов* по мере развития семядольных листьев не изменялось у ДГГ в отличие от ТГГ, у которого оно увеличивалось на 45% к 11 сут и в дальнейшем практически не изменялось (рис. 5). Сопоставление данных представленных на рис. 4 и 5 свидетельствует о том, что на долю флавоноидов в этих органах ДГГ приходилось 68% (6 сут) и 40% (11 и 19 сут) от суммарного содержания фенольных соединений, а у ТГГ – 50% и 60%, соответственно. Следовательно, по мере роста проростков накопление флавоноидов в семядольных листьях возрастало у ТГГ и снижалось у ДГГ (при одинаковом их возрасте). Возможно, эти различия обусловлены степенью их развития или уровнем пloidности растений, как это отмечалось в литературе (Sanwal et al., 2010; Pradhan et al., 2018; Liu et al., 2019).

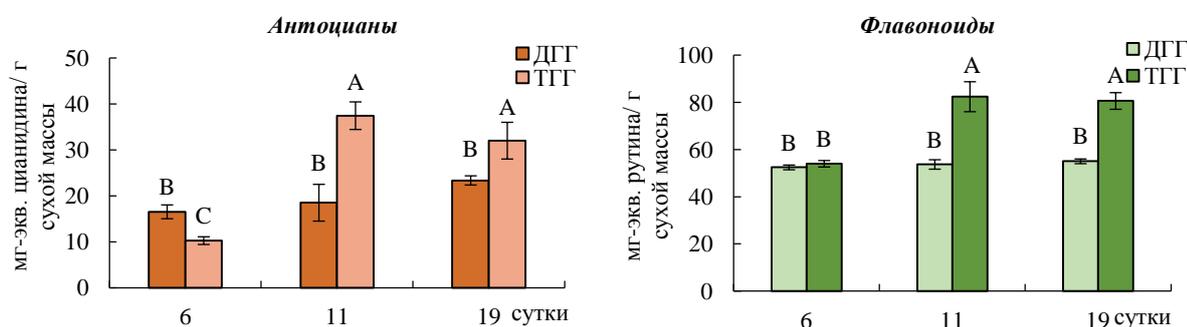


Рис. 5. Изменения в содержании антоцианов в hypocotylax и флавоноидов в семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum* по мере их роста.

Активность *L*-фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ). Одним из важных («ключевых») ферментов биосинтеза фенольных соединений является ФАЛ, осуществляющая образование *транс*-коричной кислоты из *L*-фенилаланина (Запрометов, 1996; Ritter, Schulz, 2004). С этой реакции начинается образование широкого спектра различных фенольных соединений. Как следует из представленных на рис. 6 данных ярко выраженных различий в активности ФАЛ в hypocotylax проростков двух генотипов гречихи не наблюдалось. У ДГГ она была одинаковой на начальных этапах роста (6-11 сут и возрастала к 19 сут (на 20%). В hypocotylax ТГГ – тенденция была иной: с 6 по 11 сут отмечалось снижение активности фермента (на 22%), а к 19 сут – повышение до исходного уровня.

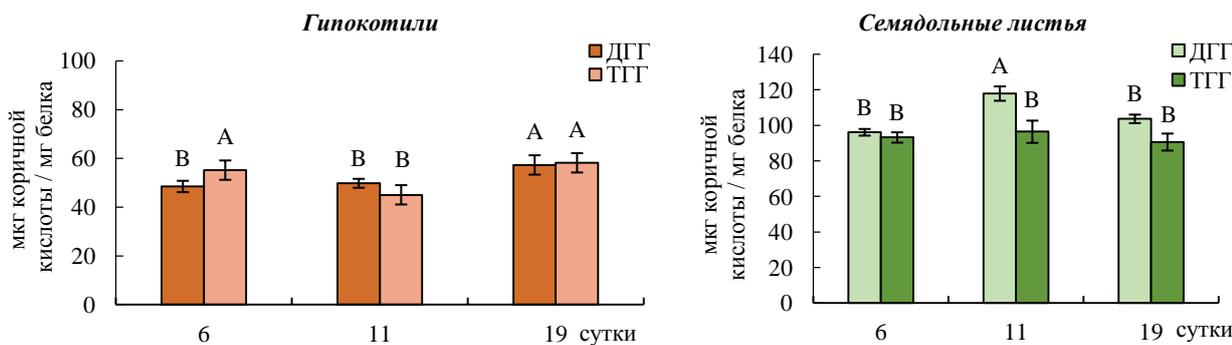


Рис. 6. Активность *L*-фенилаланинаммиакилазы в проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*.

В семядольных листьях проростков активность ФАЛ была выше, чем в гипокотилях: у ДГГ в среднем на 44-57% (в зависимости возраста проростков), у ТГГ – на 35-53% (в зависимости от периода роста), что коррелировало с суммарным содержанием фенольных соединений в этих органах. При этом в начале роста (6 сут) она была практически равной у обоих генотипов (рис. 6). В дальнейшем у ДГГ активность ФАЛ повышалась к 11 сут (на 18%), а затем (19 сут) вновь снижалась до исходного уровня, тогда как у ТГГ она сохранялась на одном уровне в течение всего периода роста проростков.

Поскольку проростки фенологической фазы «всходов» имели полностью сформированные семядольные листья, являющиеся основным местом синтеза фенольных соединений, на 14 сут, то наши дальнейшие исследования были приурочены именно к данному фенологическому возрасту.

3. Действие кадмия на проростки двух генотипов *Fagopyrum esculentum* и образование в них фенольных соединений

Кадмий (Cd) представляет собой один из наиболее распространенных в природе и токсичных поллютантов, который обладает высокой подвижностью и поступает в растительные ткани (Серегин, Иванов, 2001; Clemens, 2006; Титов и др., 2014). Следует отметить малую изученность вопроса влияния Cd на фенольный метаболизм растений, в том числе и гречихи.

Выращивание проростков двух генотипов гречихи в присутствии Cd приводило к снижению их роста (данные представлены в диссертации). Это характерно для многих видов растений (Abe et al., 2008; Масленников и др., 2013).

Распределение кадмия в проростках гречихи. Определение содержания Cd в различных органах проростков двух генотипов гречихи, выращиваемых методом рулонной культуры на водных растворах с различным содержанием $Cd(NO_3)_2$ показало его наибольшую аккумуляцию в корнях, особенно у ТГГ (рис. 7). Наиболее ярко эта тенденция была выражена при действии наибольшей концентрации металла (вариант III, исходное содержание соли кадмия в растворе – 97 мкМ), когда количество кадмия в подземных органах составило 3,64 мг/г сухого веса и 7,25 мг/г сухого веса для ДГГ и ТГГ, соответственно. При действии более низкой концентрации Cd (вариант II, исходное содержание соли кадмия в растворе – 65 мкМ) его накопление было ниже у проростков обоих генотипов (в среднем на 43% относительно варианта III). Наименьшим уровнем металла в корнях характеризовались проростки, выросшие на растворах с низким уровнем Cd (вариант I, исходное содержание соли кадмия в растворе – 65 мкМ). Следовательно, несмотря на поглощение металла из раствора фильтровальной бумагой (в среднем 25-30% к концу опыта в каждом варианте), тенденция увеличения его содержания в корнях проростков при повышении концентрации этого соединения в растворе четко прослеживалась.

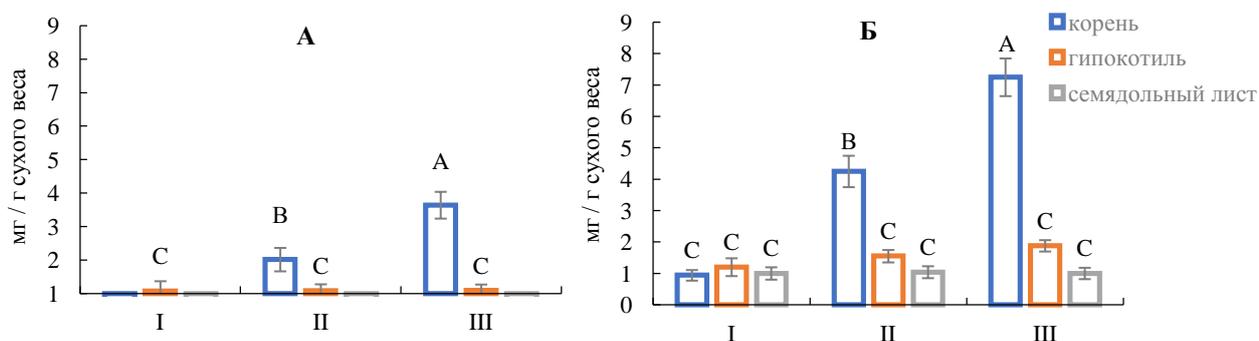


Рис. 7. Содержание Cd в различных органах проростков диплоидного (А) и тетраплоидного (Б) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных на растворах с исходным содержанием $Cd(NO_3)_2$ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

В надземных органах проростков обоих генотипов содержание Cd было невысоким, особенно в семядольных листьях, практически равным и не зависящим от его действующей концентрации (рис. 7). Все это свидетельствует о преимущественном накоплении Cd в корнях проростков гречихи и незначительном поступлении в надземные органы, что в большей степени проявлялось у ТГГ. Низкое содержание металла в hypocotyls и семядольных листьях проростков двух генотипов гречихи может быть обусловлено его связыванием с фенольными соединениями, количество которых достаточно высоко в оболочках семян этой культуры (Santos et al., 2017; Kalinová et al., 2019).

Содержание малонового диальдегида (МДА). Увеличение уровня МДА и накопление фенольных соединений отмечалось при действии тяжелых металлов за счет образования АФК (Gutierrez et al., 2017). Содержание МДА часто рассматривают как показатель «развития» стрессовой реакции в растительных тканях (Blokhina et al., 2003; Полесская, 2007).

В hypocotyls проростков обоих генотипов гречихи содержание МДА имело достаточно близкие значения как в контрольном, так и опытных вариантах (рис. 8). У ДГГ при действии Cd оно не изменялось у варианта I, но незначительно повышалось у вариантов II и III (на 11%-12% относительно контрольных условий) В hypocotyls проростков ТГГ при действии большинства исследованных концентраций Cd, за исключением варианта I, содержание МДА увеличивалось в равной степени (на 18% по сравнению с контролем).

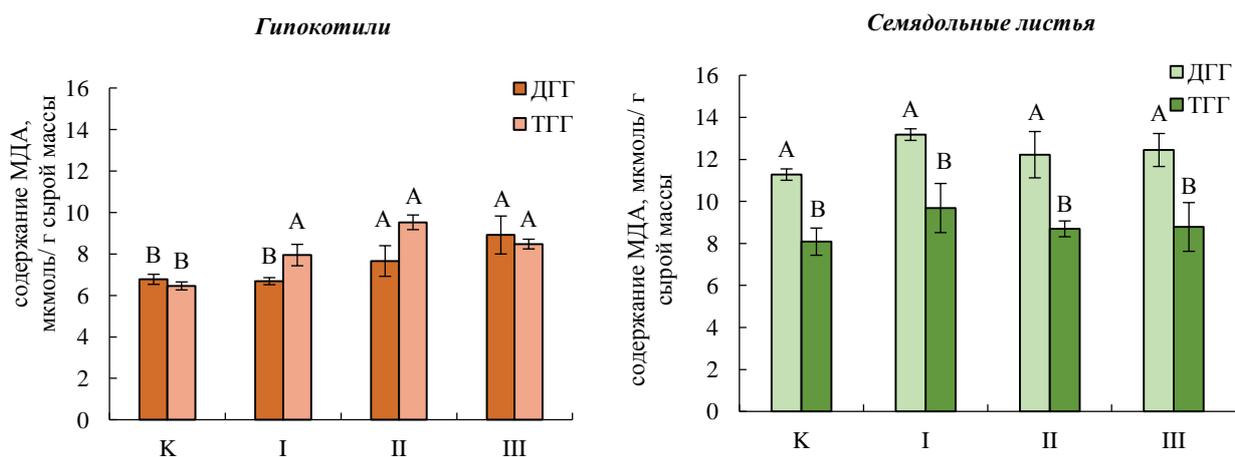


Рис. 8. Содержание МДА в проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных в стандартных условиях (К) или на растворах с исходным содержанием $Cd(NO_3)_2$ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

В семядольных листьях проростков ДГГ содержание МДА было выше такового ТГГ и при выращивании на растворах с Cd сохранялось на уровне контроля (рис. 8). Возможно,

отсутствие в них стрессовой реакции обусловлено высоким накоплением в них фенольных соединений – важных компонентов антиоксидантной системы защиты растительных клеток, способных подавлять генерацию АФК посредством хелатирования ионов металлов и образования комплексов с последними, препятствуя проявлению их токсического действия (Santos et al., 2017).

Содержание фенольных соединений. Суммарное содержание фенольных соединений в hypocotyls ДГГ при действии Cd снижалось на 31% и 48% по сравнению с контролем в вариантах I и II, соответственно, тогда как в варианте III не изменялось (рис. 9). У hypocotyls ТГГ изменений в их накоплении в опытных вариантах не отмечено.

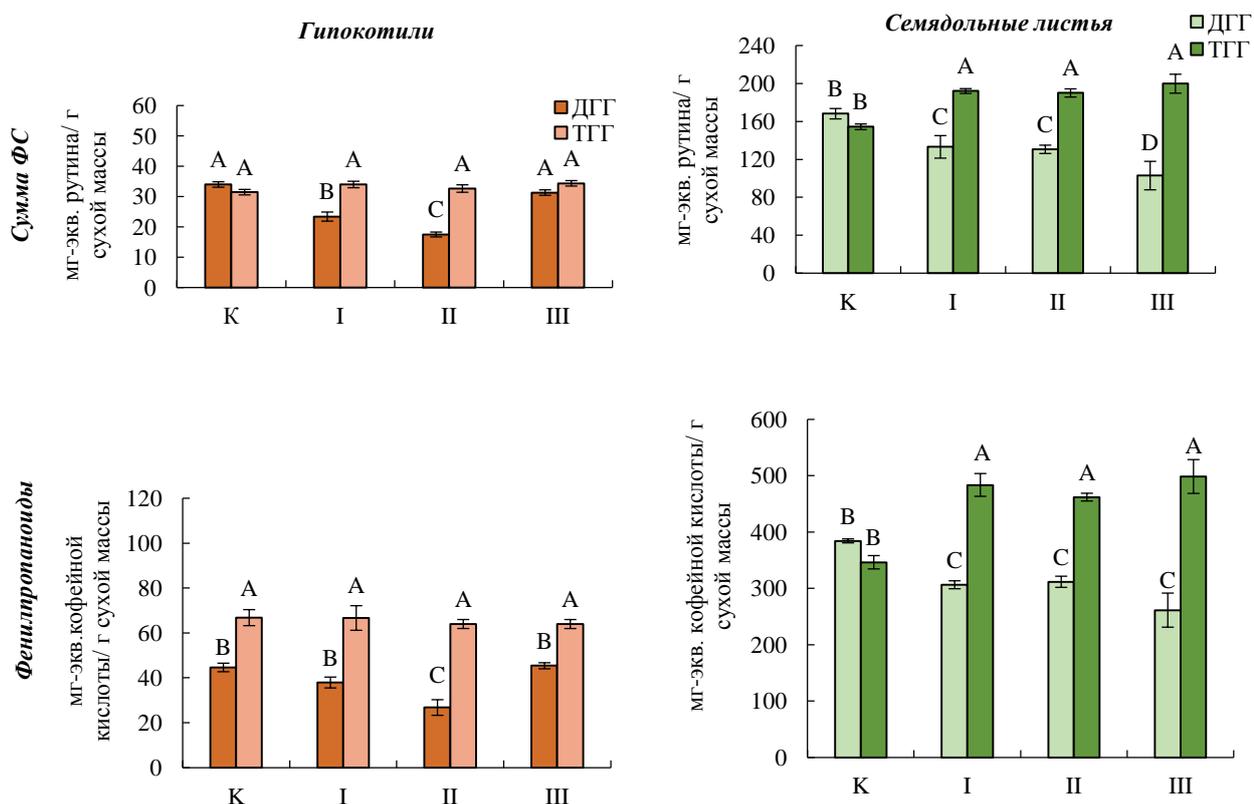


Рис. 9. Изменения в содержании суммы фенольных соединений и фенилпропаноидов в проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных в стандартных условиях (К) или на растворах с исходным содержанием $Cd(NO_3)_2$ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

В семядольных листьях проростков гречихи, подвергнутых действию Cd, тенденция суммарного накопления фенольных соединений была иной. У ДГГ оно снижалось: в вариантах I и II - в среднем на 20%, а в варианте III - на 38% (рис. 9). У ТГГ во всех опытных вариантах содержание этих веществ повышалось практически в равной степени (в среднем на 20%).

Накопление *фенилпропаноидов* в hypocotyls проростков гречихи в присутствии Cd не изменялось, за исключением варианта II для ДГГ, где их количество снижалось (на 40%) (рис. 9) В семядольных листьях их уровень либо снижался по сравнению с контролем (на 20-30% у ДГГ), либо повышался (ТГГ, в среднем на 20%).

Все это свидетельствует о том, что при поступлении Cd в надземные органы проростков двух генотипов гречихи в hypocotyls значительных изменений в содержании фенилпропаноидов не происходило, в отличие от семядольных листьев, где их уровень либо снижался (ДГГ) либо повышался (ТГГ), как это было характерно и для суммарного содержания фенольных соединений. По всей видимости, увеличение накопления фенольных соединений у ТГГ, наблюдаемое в большинстве случаев, объясняется их антиоксидантной функцией, проявляющейся как неспецифическая реакция на стресс у тетраплоидного сорта.

Антоцианы известны своими антиоксидантными свойствами, и, как правило, увеличение их накопления отмечалось в условиях стресса (Reyes et al., 2004). В гипокотильях проростков гречихи такой реакции на стрессовое воздействие Cd не наблюдалось (рис. 10). У ТГГ содержание антоцианов сохранялось на уровне контрольного варианта, а у ДГГ – снижалось и в определенной степени пропорционально действующей концентрации металла. Возможно, это обусловлено их катаболизмом или транспортом в другие органы проростков.

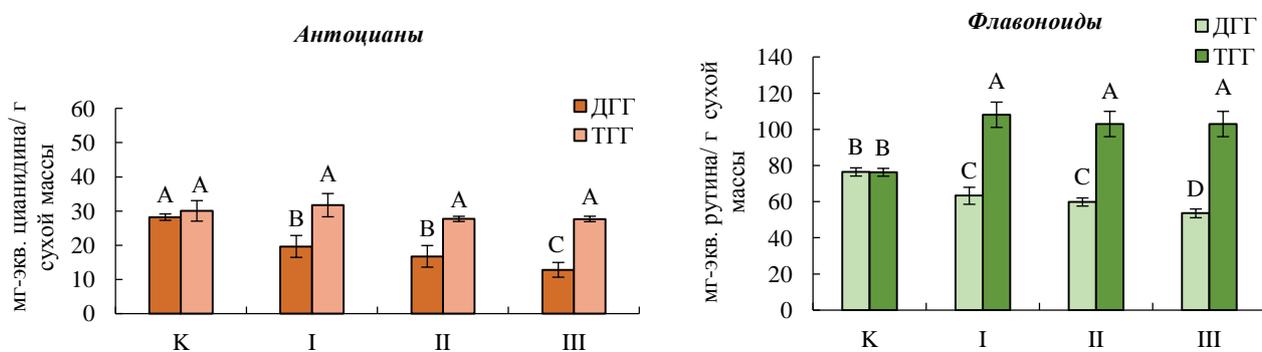


Рис. 10. Изменения в содержании антоцианов в гипокотильях и флавоноидов в семядольных листьях диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных в стандартных условиях (К) или на растворах с исходным содержанием $Cd(NO_3)_2$ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

Количество *флавоноидов* в семядольных листьях проростков ДГГ снижалось при действии Cd: в варианте I и II – на 17%, а в варианте III – на 30% относительно контрольных условий (рис. 10). Такое снижение этого класса ФС может быть обусловлено их катаболизмом или образованием характерных для гречихи олигомерных ФС (Matsui, Walker, 2020), что требует дальнейших исследований. Совершенно противоположная реакция наблюдалась у ТГГ: во всех опытных вариантах содержание флавоноидов в семядольных листьях повышалось в равной степени (на 30% по сравнению с контролем).

Все это свидетельствует об отличиях в ответной реакции проростков двух генотипов гречихи на действие Cd на уровне накопления фенольных соединений: в случае ДГГ это, как правило, проявлялось в снижении содержания этих вторичных метаболитов, а в случае ТГГ – повышении. Можно предположить, что эти различия обусловлены уровнем ploидности растений и, как следствие, различиями в их ответной реакции на воздействие этого полллютанта. Фенольные соединения участвуют в формировании биохимической адаптации растений к действию тяжелых металлов, в частности кадмия, а изменения уровня их накопления может являться показателем изменения адаптационных программ в направлении повышения устойчивости к действию негативных факторов окружающей среды, в частности, полллютантов.

Активность L-фенилаланинаммиаклиазы. Как следует из полученных нами данных, в гипокотильях проростков двух генотипов гречихи как контрольных, так и опытных вариантов активность ФАЛ была одинаковой (рис. 11). В семядольных листьях она была почти вдвое выше, чем в гипокотильях, что коррелирует с содержанием в них фенольных соединений (рис. 9, 11). Кроме того, у ДГГ в большинстве исследованных вариантов она превышала показатели у ТГГ и не зависела от действующей концентрации Cd. Исключением был вариант III (при действии высокой концентрации металла), когда активность фермента была равной у обоих генотипов. При действии различных концентрации Cd в семядольных листьях проростков ТГГ активность ФАЛ возрастала в равной степени во всех вариантах (на 25% по сравнению с контролем), тогда как у ДГГ не изменялась (рис. 11).

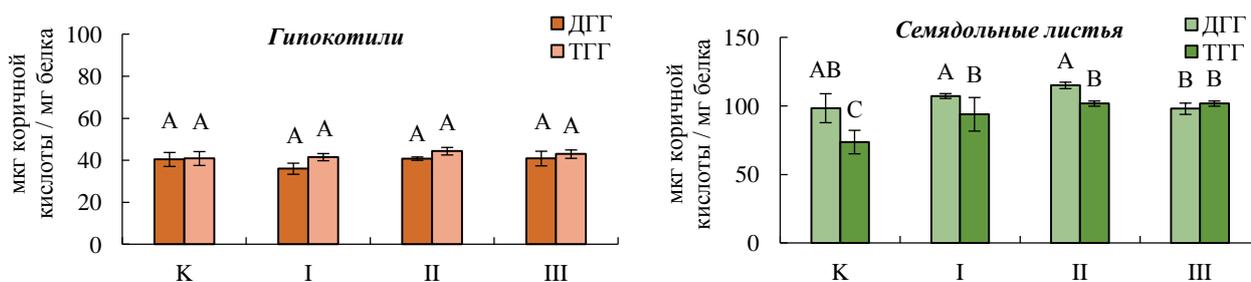


Рис. 11. Активность *L*-фенилаланинаммиакилазы в гипокотилях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных в стандартных условиях (К) или на растворах с исходным содержанием $Cd(NO_3)_2$ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

На основании полученных данных можно сделать заключение, что наибольшее накопление Cd характерно для корней проростков ТГГ, почти вдвое превышающее его содержание у ДГГ. Это, вероятно, повлияло и на накопление фенольных соединений в их надземных органах. Так, у ДГГ оно, как правило, снижалось (возможно, за счет их транспорта в корни или катаболизма), а у ТГГ – повышалось. Следовательно, проростки ДГГ и ТГГ характеризовались противоположной реакцией на действие Cd, что возможно связано с различным уровнем ploидности клеток этих растений.

4. Ответная реакция проростков двух генотипов *Fagopyrum esculentum* на действие гипотермии

Гречиха обыкновенная, являясь теплолюбивой культурой, плохо переносит действие низких положительных температур и может погибнуть при $-4^{\circ}C$ (Якименко, 1982). Следовательно, условия гипотермии могут выступать лимитирующим фактором ее развития, особенно на начальных этапах онтогенеза, что и явилось предметом нашего последующего изучения.

В условиях гипотермии отмечалось уменьшение длины корней и высоты надземной части проростков обоих генотипов гречихи, что в большей степени проявлялось после ее длительного воздействия (данные представлены в диссертации).

Содержание малонового диальдегида. После кратковременного действия гипотермии (1 сут) содержание МДА в гипокотилях проростков двух генотипов гречихи повышалось: у ДГГ на 38% относительно контрольных условий, у ТГГ – на 17% (рис. 12). В семядольных листьях достоверное увеличение этого показателя было только у ДГГ (на 19%). Это свидетельствует о более выраженных изменениях в уровне ПОЛ в надземных органах проростков ДГГ при действии гипотермии по сравнению с ТГГ.

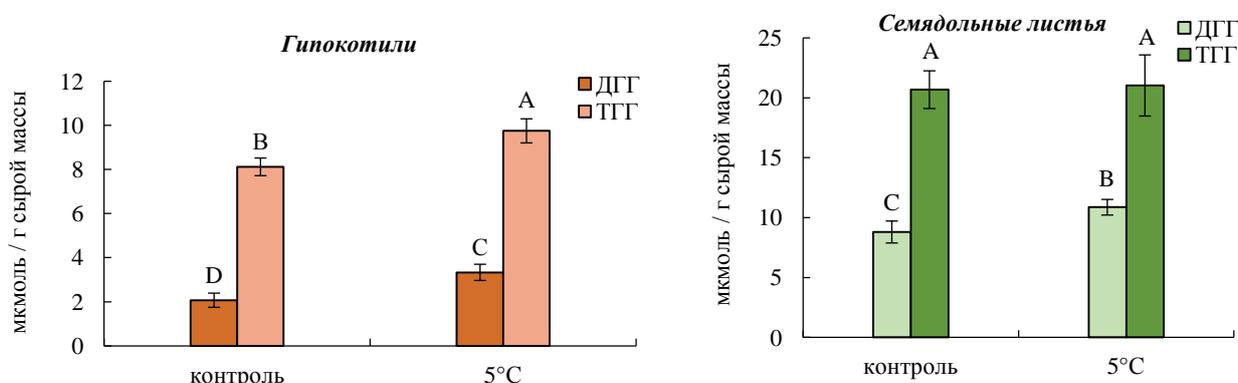


Рис. 12. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гипокотилях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных при $+24^{\circ}C$ (контроль) или подвергнутых кратковременному воздействию (1 сут) низкой положительной температуры ($5^{\circ}C$).

При более длительном воздействии гипотермии (7 суток) содержание МДА в гипокотилиях и семядольных листьях контрольных и опытных вариантов статистически не различалось (данные представлены в диссертации), что возможно связано с их адаптацией к низкотемпературному стрессу.

Содержание фенольных соединений. Известно участие фенольных соединений в защите клеток растений от различных стрессовых воздействий, включая гипотермию (Leng et al., 2000; Загоскина и др., 2011; Theocharis et al., 2012). Имеются и немногочисленные данные об изменениях в накоплении этих веществ-антиоксидантов при действии низкой положительной температуры, хотя они фрагментарны (Neugart et al., 2012).

Суммарное содержание фенольных соединений в надземных органах проростков двух генотипов гречихи после кратковременного воздействия низкой температуры в большинстве случаев не изменялось (рис. 13). Исключением являлись гипокотили ДГГ, у которых оно снижалось на 36% по сравнению с контролем.

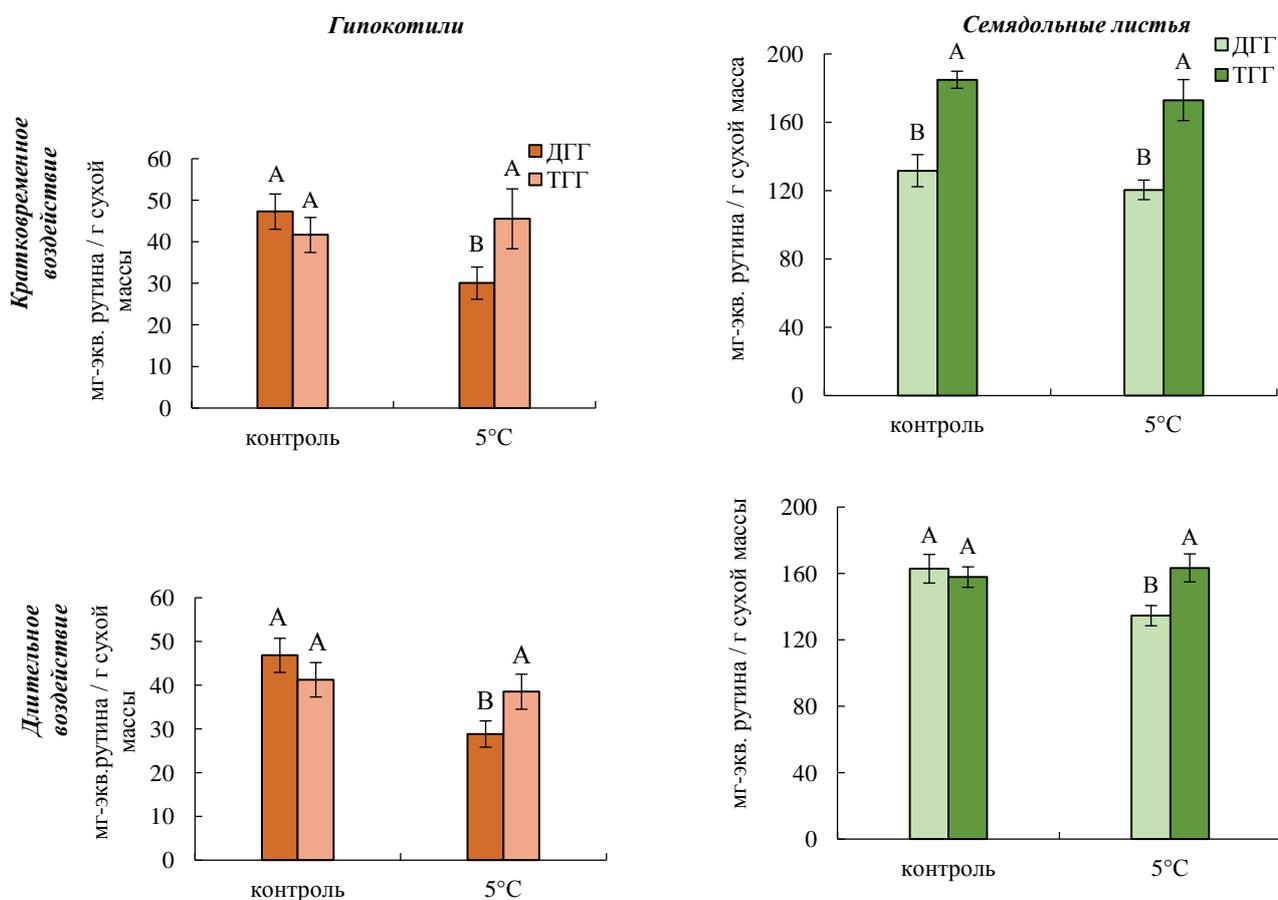


Рис. 13. Содержание суммы фенольных соединений в гипокотилиях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных при +24°C (контроль) или подвергнутых кратковременному (1 сут) и длительному (7 сут) воздействию низкой положительной температуры (5°C).

После длительного воздействия гипотермии (7 суток) суммарное содержание фенольных соединений в надземных органах проростков ДГГ было ниже, чем в контрольном варианте: в гипокотилиях - на 38%, в семядольных листьях - на 18% (рис. 13). У проростков ТГГ их количество не изменялось. Следовательно, в условиях гипотермии суммарное содержание фенольных соединений в надземных органах проростков ДГГ снижалось (в большей степени после длительного воздействия), а у ТГГ сохранялось на уровне контрольных растений.

Содержание *фенилпропаноидов* после кратковременного воздействия низкой температуры уменьшалось в гипокотилиях ДГГ и ТГГ (на 40% и 30%, соответственно) по сравнению с контрольными вариантами, но не изменялось в семядольных листьях (рис. 14).

После длительного воздействия гипотермии накопление фенилпропаноидов в надземных органах проростков обоих генотипов гречихи в большинстве случаев сохранялось на уровне контрольных вариантов. Исключением являлись гипокотили ДГГ, у которых оно снижалось (на 40% относительно контроля). Все это свидетельствует об изменениях в накоплении фенилпропаноидов в гипокотилиях проростков гречихи в условиях гипотермии (в большей степени у ДГГ) и стабильности этого процесса в семядольных листьях обоих генотипов. Уменьшение содержания этих фенольных метаболитов в гипокотилиях гречихи может быть следствием активации биосинтеза других веществ фенольной природы, предшественниками которых они являются (Ritter, Schulz, 2004; Vogt, 2010).

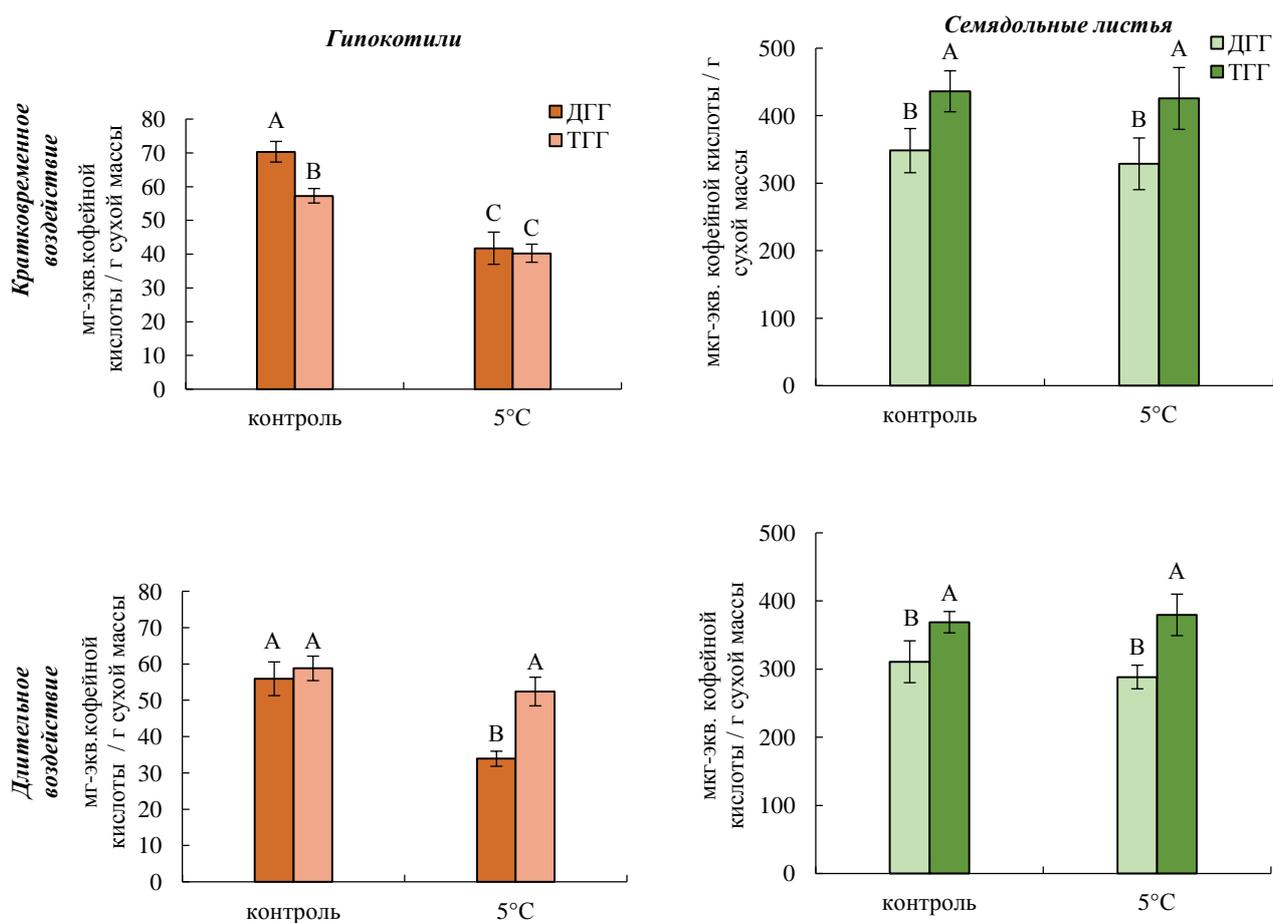


Рис. 14. Содержание фенилпропаноидов в гипокотилиях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных при +24°C (контроль) или подвергнутых кратковременному (1 сут) и длительному (7 сут) воздействию низкой положительной температуры (5°C).

При воздействии низкой положительной температуры отмечалось усиление окраски гипокотилей проростков гречихи в красно-розовый цвет за счет образования *антоцианов* – веществ фенольной природы, участвующих в защите тканей растений от стрессовых воздействий, в том числе гипотермии (Максимов, 1948; Reyes et al., 2004). У ТГГ активация их биосинтеза отмечалась уже после кратковременном ее воздействии (1 сутки), тогда как у ДГГ – после длительного (7 суток) (рис. 15). Это свидетельствует о более быстрой ответной реакции проростков ТГГ на действие гипотермии на уровне биосинтеза антоцианов, по сравнению с ДГГ.

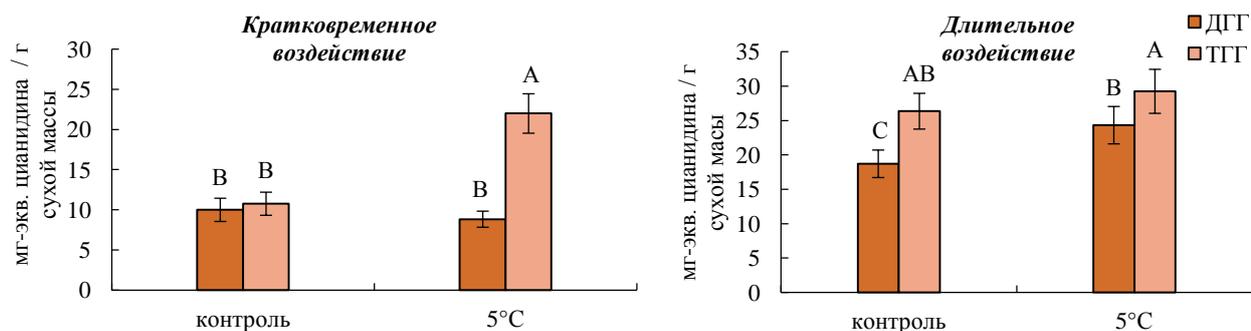


Рис. 15. Содержание антоцианов в hypocotилиях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных при +24°C (контроль) или подвергнутых кратковременному (1 сут) и длительному (7 сут) воздействию низкой положительной температуры (5°C).

Определение содержания *флавоноидов* в семядольных листьях проростков двух генотипов гречихи показало практически равный их уровень в контрольных и опытных вариантах (данные не представлены). Эти данные позволяют предположить «стабильность» биосинтеза флавоноидов в семядольных листьях двух генотипов гречихи и отсутствие влияния низкой положительной температуры на их накопление.

Активность L-фенилаланинаммиаклиазы. В семядольных листьях проростков контрольных вариантов обоих генотипов гречихи активность этого фермента была в среднем на 50% выше, чем в hypocotилиях, что согласуется с содержанием фенольных соединений в этих органах. При кратковременном воздействии низкой положительной температуры (1 сут) активность ФАЛ в проростках ДГГ была ниже относительно контроля (на 20% - в hypocotилиях, на 14% - в листьях), тогда как у ТГГ достоверных изменений не наблюдалось (рис. 16).

Аналогичная тенденция отмечалась и при длительном воздействии гипотермии (7 суток) на проростки ДГГ. Активность ФАЛ в их hypocotилиях и семядольных листьях была ниже, чем в контроле на 20%. У ТГГ также отмечалось снижение активности фермента, но только в hypocotилиях (на 40% относительно контроля).

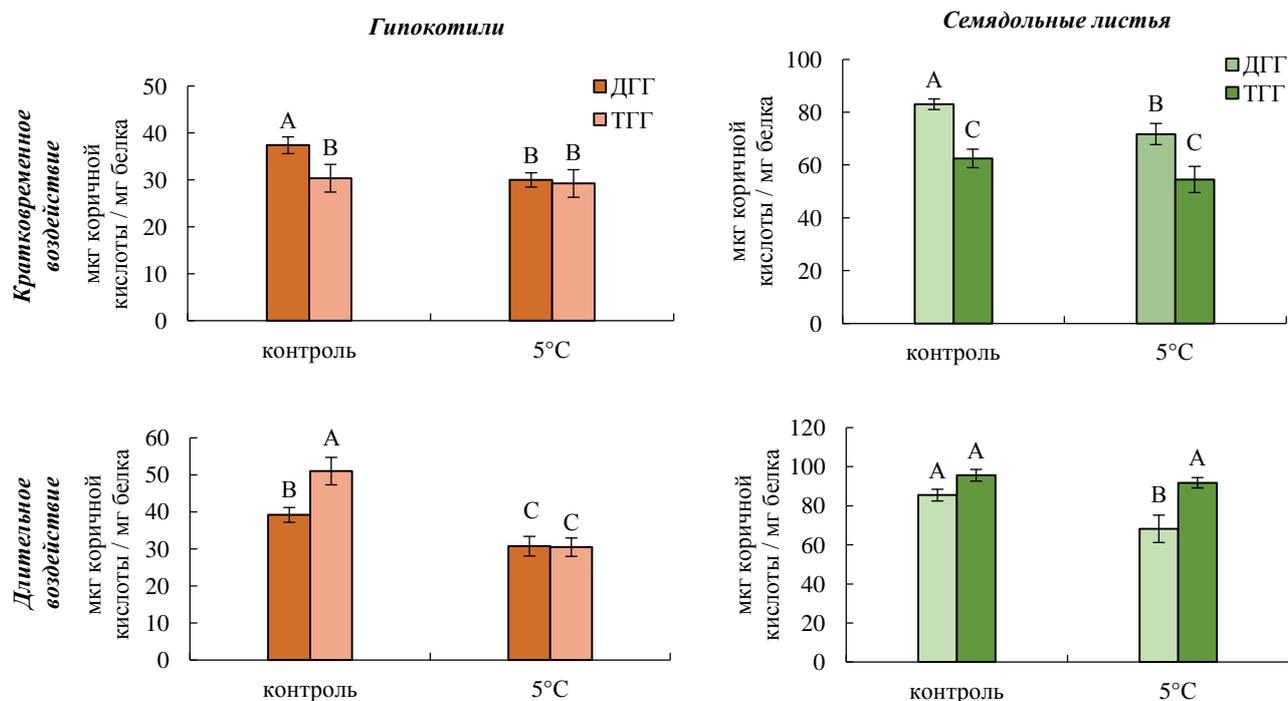


Рис. 16. Активность L-фенилаланинаммиаклиазы в проростках диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных при +24°C (контроль) или подвергнутых кратковременному (1 сут) и длительному (7 сут) воздействию низкой положительной температуры (5°C).

Таким образом, условия гипотермии вызывали изменения в содержании МДА, фенольных соединений и активности ФАЛ в надземных органах проростков гречихи. Характер ответных реакций зависел от длительности воздействия и генотипа растения. Исходя из полученных данных можно предположить большую устойчивость проростков ТГГ к действию гипотермии по сравнению с ДГГ. Это еще раз подтверждает тезис о важном значении уровня ploidy растений при сохранении их жизнеспособности, в том числе при различных экологических условиях (Sanwal et al., 2010; Pradhan et al., 2018; Liuet al., 2019).

5. Состав фенольных соединений проростков двух генотипов гречихи и его изменения при действии стрессовых факторов.

В последние годы для определения состава и содержания различных растительных метаболитов, в том числе фенольной природы, широко используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Фенольный комплекс проростков двух генотипов гречихи. В составе фенольного комплекса, полученного при экстракции проростков гречихи этанолом, идентифицированы фенолпропаноиды (хлорогеновая кислота, время удерживания 12,94) и различные флавоноиды, включая флавонолы (рутин, время удерживания 19,77) и флавоны (ориентин, изоориентин, изовитексин, витексин, время удерживания: 17,48; 17,76; 18,48; 19,26 соответственно) (рис. 17).

Доминирующими компонентами в этанольных экстрактах гипокотилей были фенолпропаноиды (хлорогеновая кислота) и флавонолы (рутин), тогда как в семядольных листьях – флавоны (ориентин, изоориентин, изовитексин, витексин) и флавонолы (рутин). Как сообщалось ранее, для гипокотилей проростков обоих генотипов гречихи характерна более низкая способность к образованию фенольных соединений по сравнению с семядольными листьями. Судя по данным ВЭЖХ, количество флавонов в этанольных экстрактах семядольных листьев проростков ДГГ и ТГГ превышало количество в экстрактах гипокотилей на 99%, а рутина – в среднем на 85-95% (табл. 1).

Таблица 1. Основные соединения фенольного комплекса этанольных экстрактов гипокотилей и семядольных листьев проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum* различного возраста и их содержание.

Возраст проростков, сутки	Генотип	Содержание фенольных соединений, мг/г сухой массы					
		Хлорогеновая кислота	Рутин	Ориентин	Изоориентин	Витексин	Изовитексин
гипокотиль							
8	ДГГ	3,75	5,25	0,50	0,75	0,25	0,50
	ТГГ	2,50	3,25	0,25	0,13	0,075	0,075
14	ДГГ	2,50	4,75	0,25	0,25	0,050	0,075
	ТГГ	4,33	7,30	0,33	0,13	-	0,066
семядольный лист							
8	ДГГ	0,75	13,27	13,9	32,26	11,45	19,54
	ТГГ	0,7	25,1	21,3	49,3	24,5	42,6
14	ДГГ	0,3	17,2	18,8	43,2	18,7	32,5
	ТГГ	1,11	25,67	21,11	44,8	32,4	57,4

В *гипокотилях* проростков двух генотипов гречихи различного возраста состав основных компонентов фенольного комплекса этанольных экстрактов был практически одинаков, за исключением 14-сут проростков ТГГ, у которых отсутствовал витексин. Однако изменилось количественное соотношение соединений. У ДГГ оно в основном снизилось по сравнению с таковым 8-сут проростков: хлорогеновой кислоты на 33%, ориентина на 50%, изоориентина – на 66%, витексина и изовитексина – на 80-85%. При этом содержание рутина практически не изменилось. Иная тенденция отмечена для этанольных экстрактов

гипокотилей проростков ТГГ. В них содержание основных полифенолов к 14 сут роста повысилось: хлорогеновой кислоты - на 42%, рутина - на 55%, ориентина - на 24%, при этом содержание изоориентина не изменилось, а изовитексина - уменьшилось (на 12%).

В *семядольных листьях* проростков обоих генотипов гречихи состав фенольных соединений этанольных экстрактов также был одинаков, а количественное соотношение отличалось. В семядольных листьях 14-сут проростков ДГГ количество флавоноидов превышало таковое 8-дневных проростков: рутина - на 23%, ориентина и изоориентина - на 25%, витексина и изовитексина - на 39%. Что касается хлорогеновой кислоты, которая относится к классу фенилпропаноидов и в небольших количествах присутствовала в семядольных листьях, то ее содержание значительно уменьшилось (на 60%). В этанольных экстрактах семядольных листьев 14-сут проростков ТГГ содержание хлорогеновой кислоты в основном повышалось относительно 8-дневных (на 37%), также как количество витексина и изовитексина (в среднем на 25%).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что состав основных соединений фенольных комплексов в надземных органах проростков двух генотипов гречихи практически не изменялся по мере их роста. При этом их содержание в гипокотилеях ДГГ в основном уменьшалось, а у ТГГ - увеличивалось. Что касается семядольных листьев, то в обоих случаях накопление фенольных соединений возрастало, особенно у ДГГ, за исключением хлорогеновой кислоты, уровень которой снижался.

Фенольный комплекс проростков двух генотипов гречихи, выращенных в контрольных условиях и в присутствии кадмия. Состав основных компонентов фенольного комплекса надземных органов проростков двух генотипов гречихи контрольного и опытного вариантов был одинаков, а его изменения при действии Cd - аналогичны.

В *гипокотилеях* проростков ДГГ, выращенных на растворах с Cd, содержание хлорогеновой кислоты в вариантах I и II повышалось на 17% и 27% соответственно по сравнению с контролем, а в варианте III - не изменялось. Содержание флавонолов и флавонов во всех опытных вариантах снижалось (табл. 2).

Таблица. 2. Содержание основных соединений фенольного комплекса этанольных экстрактов гипокотилей и семядольных листьев проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, выращенных в стандартных условиях (К) или на растворах с исходным содержанием Cd(NO₃)₂ 32 мкМ, 65 мкМ и 97 мкМ (варианты I-III, соответственно).

Вариант	Ге- нотип	Содержание фенольных соединений, мг/г сухой массы					
		Хлорогено- вая кислота	Рутин	Ориентин	Изоориен- тин	Витексин	Изовитексин,
гипокотиль							
К	ДГГ	3	4,6	0,33	0,33	0,1	0,17
	ТГГ	13	13	0,55	0,33	0,13	0,33
I	ДГГ	2,5	2,8	0,17	0,16	0,033	0,033
	ТГГ	15,6	15,6	0,4	0,2	0,08	0,2
II	ДГГ	2,17	2	0,17	0,17	0,05	0,067
	ТГГ	10	11	0,29	0,14	0,057	0,14
III	ДГГ	2,83	2,83	0,17	0,05	0,033	0,033
	ТГГ	17,2	7,8	0,4	0,06	0,08	0,2
семядольный лист							
К	ДГГ	0,4	11,9	9,5	23,5	11,7	20,4
	ТГГ	0,22	36,33	32,11	80,67	28,44	49,89
I	ДГГ	0,62	15,85	12,08	29,38	13,85	24,3
	ТГГ	0,2	49	57,8	145,2	37,6	66
II	ДГГ	0,57	14,86	12,36	30,64	12,07	20,93
	ТГГ	0,2	48	57,7	145,4	37,7	64
III	ДГГ	0,27	9,6	5,88	14,56	6,78	11,72
	ТГГ	0,2	46,8	41,3	103,7	34,1	59,9

Такая же тенденция была характерна и для гипокотилей ТГГ, за исключением хлорогеновой кислоты, содержание которой в присутствии поллютанта в основном увеличивалось в вариантах I и III (на 17% и 24% соответственно), и рутина – в варианте I (на 17%).

Что касается *семядольных листьев*, то у ДГГ в условиях действия поллютанта количество всех основных компонентов фенольного комплекса этанольных экстрактов повышалось в вариантах I и II, но снижалось в варианте III, тогда как у ТГГ - повышалось в присутствии всех концентраций Cd. Все это свидетельствует о том, что поступление этого металла в надземные органы проростков двух генотипов гречихи вызывает изменения в накоплении определенных представителей фенольных соединений.

Фенольный комплекс проростков двух генотипов гречихи, подвергнутых действию гипотермии. В условиях *кратковременного действия гипотермии* (1 сутки) в этанольных экстрактах *гипокотилей* проростков ДГГ было обнаружено 4 фенольных соединения: хлорогеновая кислота, рутин, ориентин и изоориентин (табл. 3). Их содержание было ниже, чем в контроле (см. табл.1). В условиях *длительного действия гипотермии* (7 суток) спектр основных фенольных соединений в гипокотилиях ДГГ был более разнообразен и представлен 6 компонентами: хлорогеновая кислота, рутин, ориентин, изоориентин, витексин, изовитексин. Можно отметить тенденцию к некоторому увеличению их количества по сравнению с кратковременным действием гипотермии. В экстрактах гипокотилей проростков ТГГ, подвергнутых воздействию низкой температуры различной длительности (1 сут и 7 сут), было обнаружено 6 соединений: хлорогеновая кислота, рутин, ориентин, изоориентин, витексин, изовитексин.

Таблица 3. Основные соединения фенольного комплекса этанольных экстрактов гипокотилей и семядольных листьев проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *Fagopyrum esculentum*, подвергнутых действию низкой температуры (5°C) различной длительности* и их содержание.

Вариант	Гено-тип	Содержание фенольных соединений, мг/г сухой массы					
		Хлорогеновая кислота	Рутин	Ориентин	Изоориентин	Витексин	Изовитексин
гипокотиль							
КрВ*	ДГГ	2,2	2,4	0,12	0,08	-	-
	ТГГ	5,25	5,25	0,25	0,25	0,075	0,075
ДлВ**	ДГГ	2,25	4,5	0,25	1,25	0,075	0,075
	ТГГ	6,0	9,0	0,33	0,33	0,1	0,1
семядольный лист							
КрВ*	ДГГ	1,0	27,08	20,08	46,15	25,23	44,15
	ТГГ	0,58	20,25	14,33	33,58	20,75	36,83
ДлВ**	ДГГ	1,07	18,0	13,0	29,85	18,07	31,71
	ТГГ	1,1	30,9	27,7	63,6	30,6	53

*КрВ – кратковременное воздействие, 1 сутки

**ДлВ- длительное воздействие, 7 суток

Низкотемпературный стресс не приводил к изменению состава полифенолов в экстрактах *семядольных листьев* проростков гречихи, хотя отмечены изменения в их содержании. Так, у ДГГ при *кратковременном воздействии низкой температуры* возрастало содержание хлорогеновой кислоты (на 25%), рутина (на 51%), ориентина и изоориентина (на 30%), витексина и изовитексина (на 55%), относительно условий контроля. *Длительное воздействие низкой температуры*(7 сут) приводило к увеличению количества хлорогеновой кислоты (на 72%, относительно контрольных условий). При этом содержание ориентина и

изоориентина снизилось на 31% относительно контроля, а количество рутина, витексина и изовитексина не изменилось. У ТГГ, напротив, при *кратковременном воздействии низкой температуры* содержание фенольных соединений снижалось относительно контроля: ориентина и изоориентина в среднем на 33%, хлорогеновой кислоты – на 17%, рутина, витексина, и изовитексин – на 14%. В условиях *длительного воздействия* происходило увеличение накопления рутина, ориентина и изоориентина (на 17%, 24% и 30% относительно контроля, соответственно), тогда как содержание остальных веществ не изменялось.

Полученные нами данные свидетельствуют о различной реакции фенольного комплекса проростков двух генотипов гречихи на действие гипотермии. Так, кратковременное ее влияние (1 сут) приводило к уменьшению содержания фенольных соединений у ДГГ, тогда как у ТГГ оно либо увеличивалось, либо не изменялось относительно условий контроля, тогда как в семядольных листьях тенденция была противоположной. Более длительное действие низкой температуры (7 сут) способствовало накоплению фенольных соединений в гипокотилиях проростков двух генотипов гречихи, относительно контроля, такая же тенденция прослеживалась и в семядольных листьях ТГГ. При этом в семядольных листьях ДГГ содержание хлорогеновой кислоты увеличивалось, относительно контроля, а количество остальных соединений, относящихся к классу флавоноидов, не изменялось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время внимание многих исследователей обращено к растениям, обладающим уникальной способностью к накоплению вторичных метаболитов, в частности фенольных соединений, в высоких концентрациях. Функциональная роль этих веществ важна и разнообразна, в том числе связана с их участием в защите растительных клеток от стрессовых воздействий. Гречиха посевная или обыкновенная (*Fagopyrum esculentum* Moench), накапливающая фенольные соединения во всех органах, обладает повышенным уровнем антиоксидантной активности относительно такового у других зерновых культур. Являясь теплолюбивой культурой, она очень чувствительна к воздействию низких температур, особенно на начальных этапах своего развития. Кроме того, помимо влияния низких температур на сегодняшний день наиболее распространенным и повреждающим для растений является действие поллютантов, в том числе Cd, что связано с возрастающей «техногенной нагрузкой» на окружающую среду. Однако в литературе мало численны сведения о его влиянии на растения, биосинтез которых направлен на образование фенольных соединений, в том числе на начальных этапах их онтогенеза.

Суммируя полученные нами данные можно предположить, что различные сорта гречихи на начальных этапах своего развития характеризуются практически одинаковой способностью к накоплению фенольных соединений в надземных органах, уровень которых в семядольных листьях значительно выше по сравнению с гипокотилиями, что коррелировало с активностью ключевого фермента фенольного метаболизма – ФАЛ. Использование современных методических подходов, а именно ВЭЖХ, показало большее разнообразие фенольного комплекса семядольных листьев проростков гречихи по сравнению с гипокотилиями, состав последних был представлен в основном хлорогеновой кислотой и рутином.

Кроме того, мы выявили, что по мере развития проростков содержание основных веществ фенольного комплекса в гипокотилиях ДГГ в основном уменьшалось, а у ТГГ – увеличивалось. При этом в их семядольных листьях накопление фенольных соединений возрастало, особенно у ДГГ. Исходя из этого можно предположить, что на ранних этапах онтогенеза проявляются отличия в биосинтезе этих вторичных метаболитов у генотипов гречихи с различным уровнем ploидности (2n и 4n). Выявлена и различная их реакция на действие стрессовых факторов. Так, при выращивании проростков на среде с Cd содержание фенольных соединений у ДГГ в основном снижалось, а у ТГГ повышалось. При этом важно отметить, что в подавляющем большинстве литературных данных отмечалось повышение

накопления фенольных соединений при действии различных поллютантов (Kisa et al., 2016; Manquián-Cerda et al., 2016; Gonzalez-Mendoza et al., 2018). Снижение же количества фенольных соединений в проростках гречихи может быть следствием катаболизма этих вторичных метаболитов, что отражено в литературе и, по-видимому, характерно для фенол-накапливающих растений или может быть следствием каких-то других причин и является предметом дальнейших исследований.

Что касается гипотермии, то у проростков ДГГ, как при кратковременном, так и при длительном ее воздействии, количество фенольных соединений в гипокотильях снижалось, что, по всей видимости, обусловлено ингибированием ФАЛ. При этом в семядольных листьях оно практически не менялось за исключением суммарного содержания фенольных соединений, которое при длительном ее воздействии снижалось. У ТГГ изменений в накоплении фенольных соединений не происходило, что коррелировало с активностью ФАЛ. Исключением был вариант с длительным воздействием гипотермии, когда активность фермента снижалась, а накопление этих вторичных метаболитов не изменялось. Также следует отметить, что антоцианы известные по литературным источникам своей способностью защищать растительные клетки в условиях гипотермии сыграли свою положительную роль. Так, было обнаружено их значительное накопление у тетраплоидного генотипа гречихи при кратковременном воздействии низкой температуры, а у диплоидного - при длительном ее воздействии.

При изучении действия стрессовых факторов мы также проанализировали уровень ПОЛ в надземных органах проростков двух генотипов гречихи. Было показано, что при их выращивании на средах с различными концентрациями Cd стрессовая реакция в основном развивалась в гипокотильях. В семядольных листьях не было достоверных изменений в уровне ПОЛ по сравнению с контролем, что вероятно связано с высоким содержанием в них фенольных соединений, которые способны образовывать комплексы с тяжёлыми металлами. В условиях гипотермии уровень ПОЛ в проростках гречихи в основном увеличивался при кратковременном ее действии, тогда как не было достоверных изменений при длительном воздействии, что вероятно связано с наступлением периода адаптации.

В заключении следует отметить, что проростки тетраплоидного генотипа гречихи на ранних этапах онтогенеза оказались более чувствительными в плане фенольного комплекса к воздействию стресса, но это в основном касалось действия Cd. Однако остается неясной причина снижения уровня фенольных соединений у диплоидного генотипа, что требует дальнейших исследований для выяснения механизмов регуляции биосинтеза фенольных соединений.

ВЫВОДЫ

1. Различные сорта гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) на ранних этапах онтогенеза близки по содержанию фенольных соединений, за исключением сорта Башкирская красностебельная, обладающего более высокой способностью к их накоплению.
2. Для проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи характерны схожие тенденции в образовании фенольных соединений на начальных этапах развития. Наибольшее их накопление, включая фенилпропаноиды и флавоноиды, характерно для семядольных листьев, по сравнению с гипокотильями, что коррелировало с активностью L-фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ) - ключевого фермента фенольного метаболизма.
3. Впервые исследовано распределение кадмия в проростках гречихи и установлено его более высокое содержание в корнях относительно надземных органов. Поступление металла ингибировало рост, вызывало изменения в содержании фенольных соединений, в том числе фенилпропаноидов и флавоноидов в надземных органах: у проростков ДГГ оно снижалось, у проростков ТГГ - не изменялось в гипокотильях и повышалось в семядольных листьях, что коррелировало с активностью ФАЛ.
4. Кратковременное и длительное воздействие гипотермии (5°C) в большинстве случаев не вызывало изменений в суммарном накоплении фенольных соединений, а также в накоплении

отдельных их классов в надземных органах проростков гречихи, за исключением гипокотилей у которых количество фенолпропаноидов снижалось, а антоцианов - увеличивалось и этот эффект зависел от длительности температурного воздействия и генотипа гречихи.

5. В надземных органах проростков гречихи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было определено содержание фенольных соединений: фенолпропаноидов (хлорогеновая кислота), флавонов (ориентин, изоориентин, витексин, изовитексин) и флавонолов (рутин) уровень которых в большинстве случаев был выше у ТГГ. В гипокотилеях доминировали фенолпропаноиды и флавонолы, а в семядольных листьях – флавоны и флавонолы.

6. При действии кадмия содержание всех компонентов фенольного комплекса, идентифицированных методом ВЭЖХ, повышалось в семядольных листьях проростков ДГГ и ТГГ, тогда как в гипокотилеях в основном снижалось.

7. В условиях гипотермии в гипокотилеях проростков ДГГ количество всех компонентов фенольного комплекса, идентифицированных методом ВЭЖХ, снижалось, а у ТГГ - повышалось. В семядольных листьях содержание анализируемых соединений повышалось у ДГГ и снижалось у ТГГ при кратковременном действии гипотермии, тогда как при длительном действии гипотермии тенденция была противоположной.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Фесенко А.Н., Широкова А.В., Загоскина Н.В. (2015) Особенности образования фенольных соединений в проростках гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) различных сортов. *Сельскохозяйственная биология*, **5**, 611-619.
2. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Широкова А.В. (2018) Накопление фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с различным уровнем ploидности (на примере *Fagopyrum esculentum*). *Известия РАН. Серия биологическая*, **2**, 191–199.

Работы, опубликованные в рецензированных журналах:

3. Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Широкова А.В., Загоскина Н.В. (2014) Проростки гречихи с различным уровнем ploидности и накопление в них фенольных соединений. *Известия КГТУ*, **34**, 181-188.
4. Kazantseva V., Goncharuk E., Mammadov R., Kartashov A., Zagoskina N. (2019) Influence of cadmium on morphophysiological traits and accumulation of phenolic compounds in two genotypes of buckwheat sprouts. *Bioscience Research*, **16**, 3475-3488.

Материалы конференций:

5. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Фесенко А.Н. Растения гречихи и их реакция на кратковременное действие гипотермии. В сб.: *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*. Воронеж: ВГУ, с. 61-67.
6. Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Загоскина Н.В. (2014) Образование фенольных соединений в проростках диплоидного и тетраплоидного сортов гречихи (*Fagopyrum esculentum*). В сб.: *Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий*, под ред. Роньжиной Е.С. Калининград: Аксиос, с. 224-227.
7. Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Широкова А.В., Загоскина Н.В. (2014) Накопление антоцианов в проростках диплоидного и тетраплоидного сортов гречихи (*Fagopyrum esculentum*L.). В сб.: *Актуальность идей В.Н. Хитрово в исследовании биоразнообразия России*. Орел: ОГУ, с. 171-173.

8. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. (2014) Гречиха культурная (*Fagopyrum esculentum* Moench): распространение, сорта, биологические активные соединения. В сб.: *Актуальные проблемы биологической и химической экологии*. Мытищи: МГОУ, с. 60-62.
9. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. (2015) Реакция *Fagopyrum esculentum* на действие поллютанта. В сб.: *Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений*. Москва, с. 321-324.
10. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Глотова И., Живухина Е.А., Загоскина Н.В. (2015) Образование фенольных соединений на ранних этапах онтогенеза гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench). В сб.: *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты*, под ред. Загоскиной Н.В. Москва: ИФР РАН, с. 286-290.
11. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. (2015) Об образовании фенольных соединений у сортов гречихи с различным уровнем ploидности. В сб.: *Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с.233.
12. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. (2016) Изменения в образовании низкомолекулярных антиоксидантов фенольной природы на начальных этапах роста растений гречихи в присутствии кадмия. В сб.: *Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде*, под ред. Войникова В.К. Иркутск: ИГ СО РАН, с. 99-100.
13. Казанцева В.В. (2017) Антиоксидантная система проростков гречихи (*Fagopyrum esculentum*). В сб.: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*, под ред. Солдатенко А.В. Одинцово: ВНИИСОК, с. 160-161.
14. Казанцева В.В. (2017) Образование фенольных соединений в проростках *Fagopyrum esculentum* в норме и при гипотермии. В сб.: «ЛОМОНОСОВ-2017», под ред. Алешковский И.А., и др. Москва: МАКС Пресс, [Электронный ресурс]. https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2017/data/10748/uid108336_report.pdf
15. Казанцева В.В. (2017) Полиплоидия и накопление фенольных соединений в растениях (на примере *Fagopyrum esculentum*). В сб.: *Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции*, под ред. Шкурят Т.П. и др. Ростов-на-Дону: ЮФУ, с. 17-18.
16. Казанцева В.В., Загоскина Н.В., Гончарук Е.А. (2018) Совместное действие кадмия и низкой температуры на накопление фенольных соединений в *Fagopyrum esculentum*. В сб.: *Фенольные соединения: функциональная роль в растениях*, под ред. Загоскиной Н.В. Москва: ИФР РАН, с. 170-174.
17. Казанцева В.В., Загоскина Н.В. Гречиха (*Fagopyrum esculentum*) – важный продуцент биофлавоноидов. (2018) В сб.: *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. Сочи: ВНИИСОК, с. 54-58.
18. Казанцева В.В. (2018) Фенольный комплекс листьев диплоидного и тетраплоидного сортов *Fagopyrum esculentum*. В сб.: «ЛОМОНОСОВ-2018», под ред. Алешковский И.А., и др. Москва: МАКС Пресс, [Электронный ресурс]. https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2018/data/12725/74541_uid108336_report.pdf
19. Казанцева В.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Цыпурская Е.В., Лапшин П.В., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. (2019) Влияние антиоксиданта фенольной природы эпикатехина на устойчивость проростков гречихи (*Fagopyrum esculentum* L.) к низкотемпературному стрессу. В сб. «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений», под ред. Гинс М.С. Москва: РУДН, с. 275-278.