

УДК 581.1

УРОВЕНЬ ПЛОИДНОСТИ РАСТЕНИЙ И НАЛИЧИЕ КАДМИЯ В СРЕДЕ ВЫРАЩИВАНИЯ ИЗМЕНЯЮТ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА В ПРОРОСТКАХ ГРЕЧИХИ

© 2022 г. В. В. Казанцева^{1,*}, Е. А. Гончарук¹, Г. П. Зайцев²,
Н. В. Загоскина¹, член-корреспондент РАН А. Г. Клыков³

Поступило 06.09.2021 г.

После доработки 17.09.2021 г.

Принято к публикации 17.09.2021 г.

Впервые методом высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы состав и содержание основных компонентов фенольного комплекса надземных органов растений гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) с различным уровнем ploидности (2n и 4n) на начальных этапах онтогенеза и их изменениях при действии кадмия (Cd; 65 мкМ). Фенольные соединения (ФС) во всех вариантах были представлены хлорогеновой кислотой (фенилпропаноид), рутином (флавонол), а также ориентином, изоориентином, витексином и изовитексином (флавоны). Их количество в семядольных листьях в большинстве случаев превышало таковое в гипокотилеях. Для проростков гречихи тетраплоидного генотипа характерно более высокое накопление ФС по сравнению с диплоидным. При действии Cd содержание отдельных их представителей изменялось: в гипокотилеях диплоидного генотипа оно в большинстве случаев снижалось, а у тетраплоидного – возрастало, тогда как в семядольных листьях – тенденция была противоположной. Установлено, что проростки двух генотипов *F. esculentum* с различным уровнем ploидности отличались по содержанию основных ФС и ответной реакции на действие Cd, что имеет важное значение для селекции этой культуры в отношении стресс-устойчивости.

Ключевые слова: гречиха, *Fagopyrum esculentum*, проростки, надземные органы, кадмий, фенольные соединения, состав, содержание

DOI: 10.31857/S2686738922010115

Фенольные соединения (ФС) представляют собой одни из наиболее распространенных вторичных метаболитов растений, для которых характерна высокая антиоксидантная активность [1]. Они имеют важное значение при защите растительных клеток от активных форм кислорода (АФК), количество которых повышается при стрессовых воздействиях, и “дополняют” действие высокомолекулярных ферментов-антиоксидантов [2].

К наиболее агрессивным стрессорам в биосфере относятся тяжелые металлы, в том числе широко распространенный и высокотоксичный кадмий (Cd) [3]. Он влияет на рост растений, изменяет их физиолого-биохимические характеристики, снижает качество сельскохозяйственной продукции, а также наносит вред здоровью человека в связи с поступлением в пищевые цепи. Известно, что Cd вызывает повреждение мембран, нарушает транспорт электронов, ингибирует/активирует ферменты, влияет на структуру ДНК и приводит к другим метаболическим изменениям [4]. Несмотря на все это, растения сохраняют жизнеспособность, в том числе и за счет накопления антиоксидантов фенольной природы [5, 6]. Предполагают, что эти вторичные метаболиты могут выступать в качестве биомаркеров воздействия на них металлов.

К числу важнейших культур промышленного использования во многих странах мира относится гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum*). Для нее характерно накопление ФС, преимущественно

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач” Российской академии наук, Ялта, Россия

³ Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск, Россия

*e-mail: vkazantceva90@gmail.com

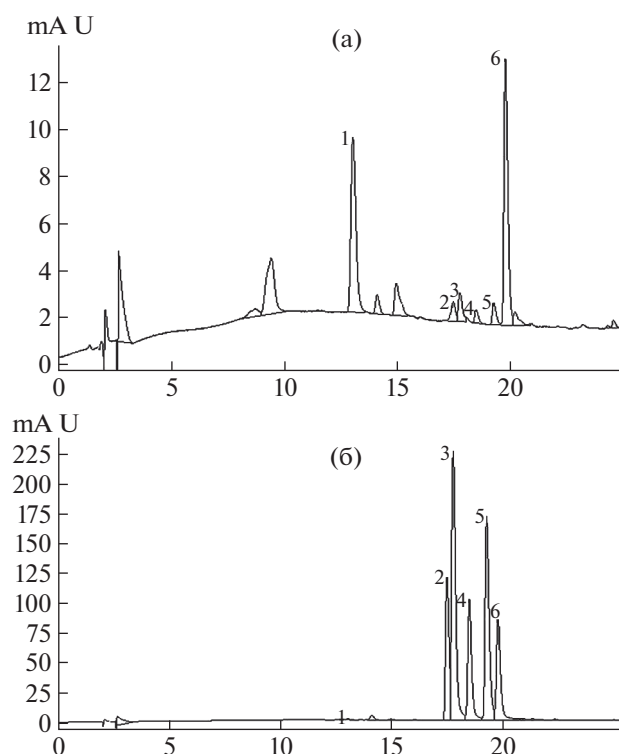


Рис. 1. ВЭЖХ хроматограммы этанольных экстрактов гипокотилей (а) и семядольных листьев (б) проростков гречихи (Base Peak Chromatogram, 350 нм). По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – сигнал детектора, единицы оптической плотности. Основные фенольные соединения: хлорогеновая кислота (1), ориентин (2), изоориентин (3), витексин (4), изовитексин (5), рутин (6).

флавоноидов – веществ с высокой антиоксидантной активностью [7]. Литературные данные свидетельствуют об ее высокой устойчивости к действию алюминия [8], способности к накоплению свинца [9], но крайне мало данных о влиянии на нее Cd [10, 11].

Одной из характерных особенностей растительных организмов является уровень их ploидности [12]. Предполагается, что при его повышении может отмечаться более выраженная устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов окружающей среды. В некоторых случаях это сопровождалось накоплением в тканях ФС [13]. Однако до сих пор ясности в этом вопросе нет.

В настоящей работе представлены приоритетные данные, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, о составе и содержании основных компонентов фенольного комплекса надземных органов проростков гречихи с различным уровнем ploидности ($2n$ и $4n$), выращенных в стандартных условиях и в присутствии Cd. Впервые выявлено более высокое накопление ФС у тетраploидного генотипа этой культуры по сравнению с диплоидным. Получены новые данные о влиянии Cd на содержание

фенольных биоантиоксидантов в ценной сельскохозяйственной культуре гречихи.

Исследования проводили на проростках гречихи посевной (*F. esculentum* Moench) с различным уровнем ploидности, используя для этого сорта Девятка ($2n = 16$) и Большевик 4 ($4n = 32$). Их выращивали рулонным способом в течение 14 дней на воде (контроль) или водном растворе $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (концентрация 65 мкМ была подобрана в предварительных экспериментах, не вызвала гибели проростков) при $+24^\circ\text{C}$ и 16-час. фотопериоде (5000 люкс).

Состав и содержание ФС определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [14]. Гипокотили и семядольные листья проростков гречихи экстрагировали 96% этанолом (45°C , 45 мин). Гомогенат центрифугировали (18000 г/мин, 2 мин), надосадочную жидкость отделяли и анализировали с использованием системы Agilent Technologies (модель 1100). Хроматограф укомплектован проточным вакуумным дегазатором G1379A, 4-канальным насосом градиента низкого давления G1311A, автоматическим инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, диодноматричным детектором G1316A и флуоресцентным детектором G1315B.

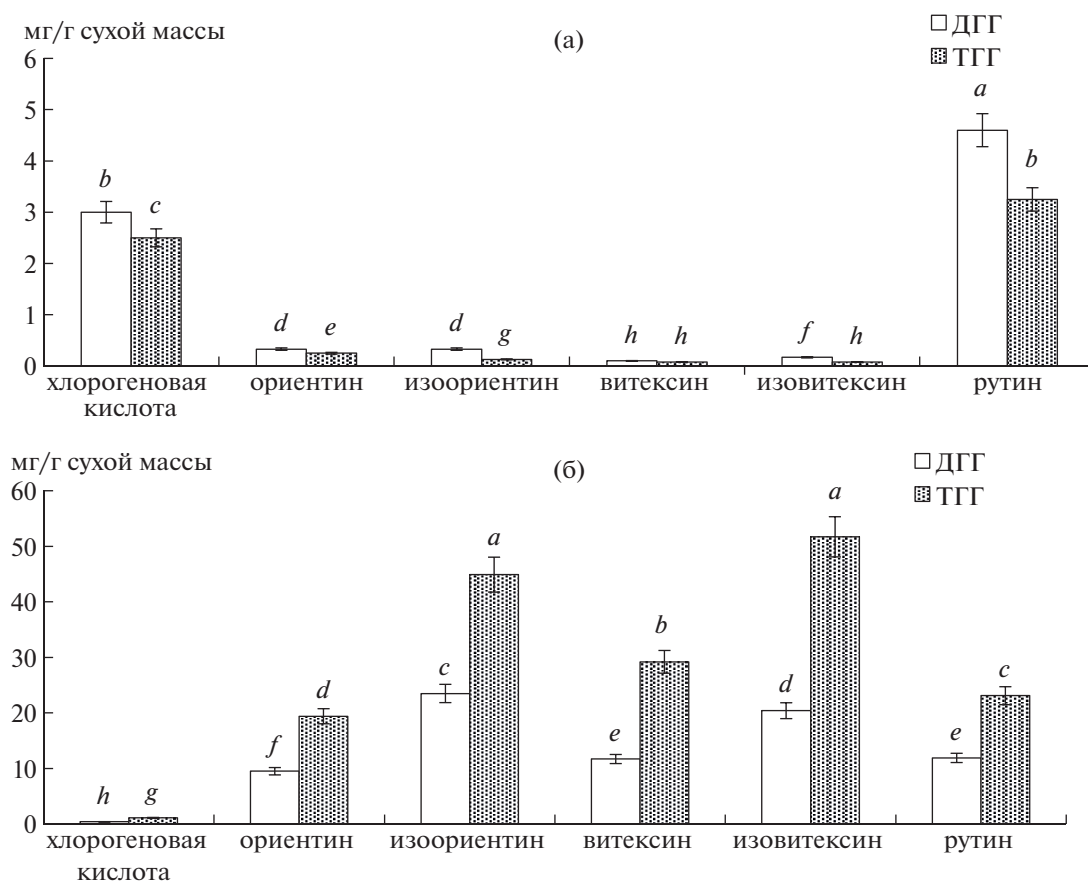


Рис. 2. Содержание различных фенольных соединений в hypocотилиях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи, выращенных в стандартных условиях. Достоверность различий средних значений определяли по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0.05$ и обозначали ее разными латинскими буквами.

Для разделения ФС применяли хроматографическую колонку “ZORBAX” SB-C18 (2.1 × 150 мм), заполненную силикагелем с привитой октадецилсилильной фазой зернением 3.5 мкм. Состав элюента: раствор А – метанол, раствор В – 0.6%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Состав элюента изменялся по следующей схеме (по содержанию компонента В): 0 мин – 8%; 0–8 мин – 8–38%; 8–24 мин – 38–100%; 24–30 мин – 100%. Скорость потока элюента – 0.25 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Хроматограммы регистрировали при 280 нм (для хлорогеновой кислоты) и 350 нм (для флавоноидов). Идентификацию ФС производили путем сравнения их спектральных характеристик и времени удерживания с аналогичными характеристиками стандартов. Спектральные характеристики отдельных веществ получали с использованием данных литературы [14, 15]. Содержание ФС рассчитывали по калибровочным графикам зависимости площади пика от концентрации вещества.

В экспериментах использовали 3-кратные биологические и 2-кратные аналитические повторности измерений. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 12.5. На рисунках представлены средние арифметические значения определений и их стандартные ошибки (\pm SEM). Достоверность различий средних значений определяли по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0.05$ и обозначали ее разными латинскими буквами.

Состав ФС, экстрагируемых этанолом из надземных органов проростков двух генотипов гречихи, выращенных как в стандартных условиях, так и в присутствии Cd, был одинаков (рис. 1). Он представлен наиболее разнообразной группой ФС – флавоноидами, образование которых характерно для большинства растений [7]. Их накопление в большей степени было выражено в семядольных листьях, которое значительно превышало таковое в hypocотилиях (рис. 2, 3). Это, вероятно, обусловлено функционированием в них хлоропластов – одного из основных мест их биосинтеза [1]. Преобладающими флавоноидами

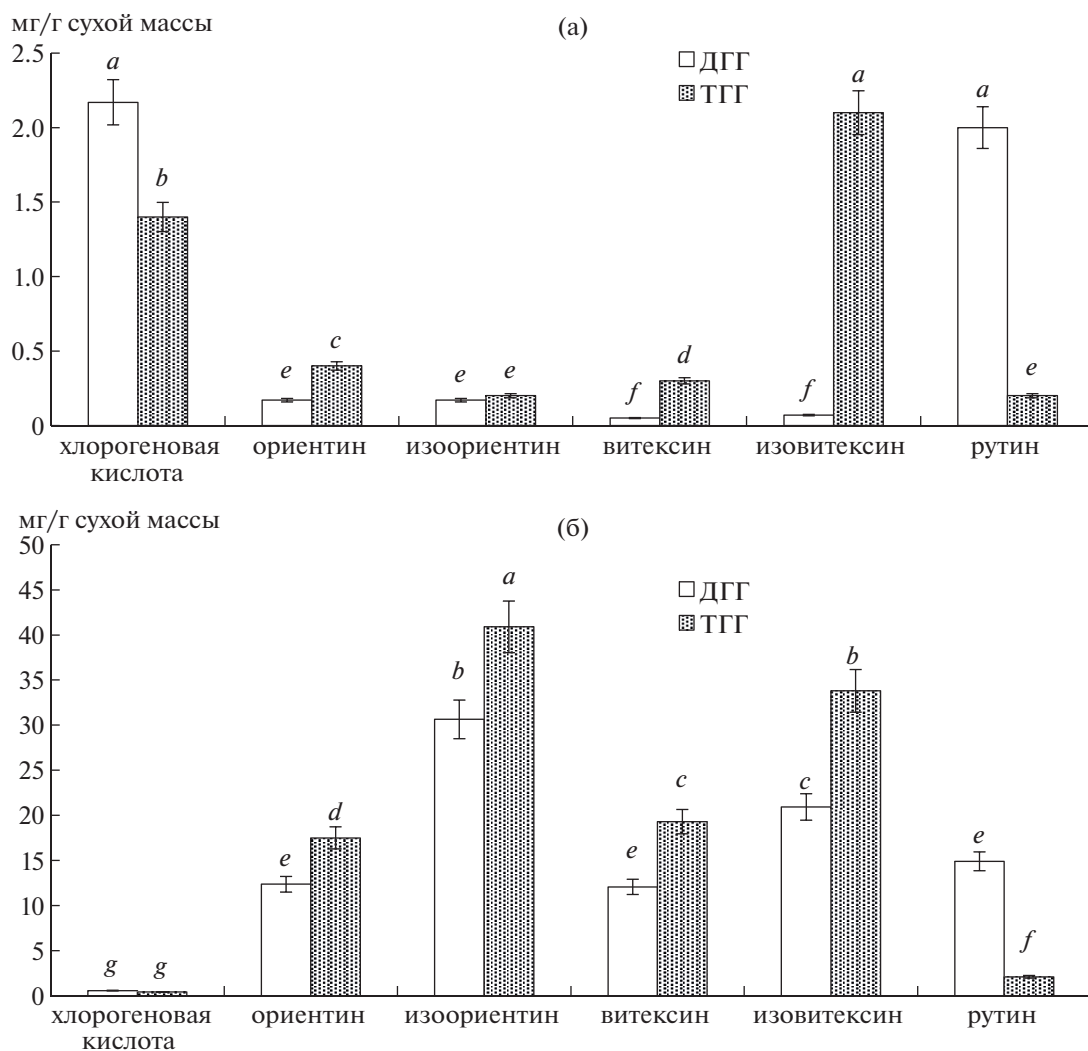


Рис. 3. Содержание различных фенольных соединений в hypocotилиях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов гречихи, выращенных в присутствии Cd (65 мкМ). Достоверность различий средних значений определяли по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0.05$ и обозначали ее разными латинскими буквами.

надземных органов проростков двух генотипов гречихи были флавоны, такие как ориентин, изоориентин, витексин, изовитексин, а также флавонол рутин (рис. 1).

Как отмечалось ранее, образование флавонов характерно лишь для начальных этапов онтогенеза гречихи [7]. Во всех вариантах присутствовала хлорогеновая кислота, представляющая собой сложный эфир кофейной и хинной кислот и относящаяся к фенолпропаноидам, количество которой было высоким в hypocotилиях (рис. 1а).

Следующим этапом наших исследований было определение содержания основных ФС в надземных органах проростков двух генотипов гречихи, выращенных в стандартных условиях в отсутствие Cd (рис. 2). В hypocotилиях доминиро-

вали хлорогеновая кислота и рутин, содержание которых у ДГГ было выше, по сравнению с ТГГ.

В семядольных листьях преобладали флавоны (ориентин, изоориентин, изовитексин, витексин) и флавонолы (рутин), содержание которых превышало таковое в hypocotилиях в среднем на 96 и 61% у ДГГ, а у ТГГ – на 99 и 94% соответственно. Следует также отметить более высокую способность к накоплению этих метаболитов в семядольных листьях проростков ТГГ, которое было вдвое выше, чем у ДГГ. Основными ФС были изоориентин и изовитексин, содержание которых у ДГГ и ТГГ составило 56 и 29% от общего количества ФС (рис. 2).

Фенилпропаноиды – еще одна группа ФС гречихи, которые также являются биологически активными соединениями и могут выполнять анти-

оксидантную функцию [2]. При этом в большинстве литературных источников по гречихе сообщается о накоплении флавоноидов и очень мало о фенилпропаноидах. В гипокотилиях ДГГ и ТГГ, выращенных в стандартных условиях, на их долю приходилось соответственно 35 и 40% от общего содержания в них ФС, тогда как в семядольных листьях — только 0.5%. Высокое содержание хлорогеновой кислоты в гипокотилиях можно рассматривать как “резерв” кофейной кислоты, используемой для образования лигнина в стеблях проростков гречихи для придания им механической прочности [1].

Литературные данные свидетельствуют о различных тенденциях в изменении содержания и состава ФС при действии Cd на растения, хотя в большинстве случаев сообщалось об увеличении их накопления [16, 17]. В нашем эксперименте не выявлено изменений в составе ФС надземных органов проростков гречихи, хотя их содержание изменялось (рис. 3). Так, в условиях действия Cd в гипокотилиях проростков ДГГ количество хлорогеновой кислоты уменьшалось на 27% по сравнению с контролем, ориентина и изоориентина — на 48%, витексина — на 50%, изовитексина — на 60%, рутина — на 56%. Иная тенденция отмечалась в гипокотилиях проростков ТГГ, где их уровень повышался относительно контроля: хлорогеновой кислоты — на 28%, ориентина — на 50%, изоориентина и витексина на 86%, изовитексина на 90%, рутина — на 38%.

Изучение содержания ФС в семядольных листьях показало, что у проростков ДГГ, подвергнутых действию поллютанта, количество хлорогеновой кислоты повышалось в среднем на 32% относительно контроля, количество ориентина и изоориентина — на 23%, а количество витексина и изовитексина не изменялось (рис. 3). У проростков ТГГ в присутствии Cd тенденция была противоположной, что выражалось в снижении количества большинства основных компонентов фенольного комплекса семядольных листьев. Так, содержание хлорогеновой кислоты уменьшалось на 60% относительно контроля, ориентина — на 10%, витексина и изовитексина — на 34%, тогда как содержание изоориентина и рутина не изменялось.

Впервые получены данные, свидетельствующие об отличиях в ответной реакции проростков двух генотипов гречихи на действие Cd, которая зависела как от уровня их ploидности (2n и 4n), так и исследуемого органа (гипокотили, семядольные листья). Судя по литературным данным [1], снижение количества ФС в стрессовых условиях может быть следствием либо их транспорта в другие органы проростков, либо катаболизма и использования в качестве дополнительного источника углерода. Таким образом, оценка гено-

типов гречихи на начальном этапе онтогенеза по содержанию и составу ФС, в том числе в условиях действия Cd, может быть использована в практической селекции при отборе растений, устойчивых к стрессовым факторам.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках темы государственного задания Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук № АААА-А-19-11904189005-8.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cheyrier V., Comte G., Davies, K.M., et al.* // Plant Physiol. and Biochem. 2013. V. 72. P. 1–20.
2. *Biela M., Rimarcik J., Senajova E., et al.* // Phytochem. 2020. V. 180. P. 112528.
3. *Vardhan K.H., Kumar P.S., Panda R.C.* // J. Molecular Liquids. 2019. V. 290. P. 111197.
4. *Seregin I.V., Ivanov V.B.* // Rus. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 523–544.
5. *Elguera J.C.T., Barrientos E.Y., Wrobel K., et al.* // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 431–441.
6. *Chen S., Wang Q., Lu H., et al.* // Ecotoxicol. and Environ. Saf. 2019. V. 169. P. 134–143.
7. *Borovaya S.A., Klykov A.G.* // Plant Biotechnol. Rep. 2020. V. 14. P. 213–225.
8. *Shen R.F., Chen R.F., Ma J.F.* // Plant and Soil. 2006. V. 284. P. 265–271.
9. *Horbowicz M., Dębski H., Wiczkowski W., et al.* // Pol. J. Environ. Stud. 2013 V. 22. P. 1723–1730.
10. *Nikolic D.B., Samardzic J.T., Bratic A.M., et al.* // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 3488–3494.
11. *Kazantseva V., Goncharuk E., Mammadov R., et al.* // Biosci. Res. 2019. V. 16. P. 3475–3488.
12. *Adams K.L., Wendel J.F.* // Plant Biol. 2005. V. 8. P. 135–141.
13. *Pradhan S.K., Gupta R.C., Goel R.K.* // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32. P. 2476–2482.
14. *Woodring P.J., Edwards P.A., Chisholm M.G.* // J. Agric. Food Chem. 1990. V. 38. P. 729–732.
15. *Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., et al.* // Mutat. Res-Fund. Mol. M. 2003. V. 523. P. 87–97.
16. *Ulusu Y., Öztürk L., Elmastaş M.* // Rus. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 883–888.
17. *Zoufan P., Azad Z., Ghahfarokhie A.R., et al.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 187. P. 109811.

PLANT PLOIDY LEVEL AND THE PRESENCE OF CADMIUM IN THE GROWING ENVIRONMENT CHANGES THE CONTENT OF THE MAIN COMPONENTS OF THE PHENOLIC COMPLEX IN BUCKWHEAT SPROUTS

V. V. Kazantseva^{a, #}, E. A. Goncharuk^a, G. P. Zaitsev^b, N. V. Zagoskina^a,
and Corresponding Member of the RAS A. G. Klykov^c

^a K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation

^b Federal State Budgetary Institution of Science "All-Russian National Scientific Research Institute
of Vineyards and Wine Maharach" RAS, Yalta, Russian Federation

^c Federal Research Center of Agricultural Biotechnology of the Far East Named After A.K. Chaiki, Ussuriysk, Russian Federation

[#]e-mail: vkazantseva90@gmail.com

For the first time, the composition and the content of the main components of the phenolic complex of aboveground organs of buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench) with different levels of ploidy (2n and 4n) at the initial stages of ontogenesis and their changes under the action of cadmium (Cd) have been studied by the method of high-performance liquid chromatography. In all variants phenolic compounds (PC) were represented by chlorogenic acid (phenylpropanoid), rutin (flavonol), as well as orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin (flavones). The amount of which in cotyledon leaves exceeded that in hypocotyls in most cases. Buckwheat seedlings of the tetraploid genotype are characterized by a higher accumulation of PC as compared to diploid genotype. Under the effect of Cd, the content of their individual representatives changed: in hypocotyls of the diploid genotype it decreased in most cases, while in of the tetraploid genotype it increased, while in cotyledon leaves the tendency was opposite. It was found that seedlings of two *F. esculentum* genotypes with various ploidy levels differed in the content of the main PC and their response to the influence of Cd, which is important for the selection of this culture in relation to stress resistance.

Keywords: buckwheat, *Fagopyrum esculentum*, seedlings, aboveground organs, cadmium, phenolic compounds, composition, content