

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА БАЛАНС ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ ГРЕЧИХИ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ПЛОИДНОСТИ

© 2021 г. Е. А. Гончарук^{а, *}, В. В. Казанцева^а, Н. В. Загоскина^а

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 17.02.2021 г.

Принята к публикации 19.02.2021 г.

Изучено воздействие гипотермии (5°C; 1 и 7 суток) на ростовые процессы и накопление фенольных соединений в надземных органах проростков ди- и тетраплоидных генотипов гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench). Установлено, что у проростков диплоидного генотипа изменения всех исследованных параметров были выражены в большей степени по сравнению с тетраплоидным генотипом. В условиях гипотермии это проявлялось в снижении высоты проростков и длины корневой системы по сравнению с контролем, повышении уровня малонового диальдегида и уменьшении суммарного содержания фенольных соединений в надземных органах диплоидного генотипа, в отличие от тетраплоидного. На фоне действия низкой температуры количество фенилпропаноидов в гипокотиле проростков обоих генотипов гречихи снижалось, тогда как накопление антоцианов в большинстве случаев повышалось, что зависело от длительности низкотемпературного воздействия и генотипа. В то же самое время гипотермия не приводила к изменениям в содержании фенилпропаноидов и флавоноидов в семядольных листьях обоих генотипов, которое сохранялось на уровне контрольных вариантов. Активность ключевого фермента фенольного метаболизма *L*-фенилаланинаммиаклиаза в надземных органах проростков при гипотермии либо не изменялась, либо снижалась. Таким образом, проведенные исследования по изучению баланса фенольных соединений в проростках двух генотипов гречихи впервые показали его зависимость от уровня ploидности клеток и температурных условий выращивания растений.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum*, гречиха, проростки, гипотермия, морфофизиологические параметры, малоновый диальдегид, фенольные соединения, фенилпропаноиды, флавоноиды, *L*-фенилаланинаммиаклиаза

DOI: 10.31857/S0015330321050043

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные соединения (ФС) относятся к вторичным или специализированным (“specialized metabolites”) метаболитам, которые широко распространены в растениях и чрезвычайно разнообразны по структуре, свойствам и биологической активности [1, 2]. Они представлены преимущественно фенилпропаноидами, флавоноидами, а также нерегулярными трехмерными полимерами — лигнинами. Функциональная роль ФС разнообразна и связана с регуляцией роста и развития растений, процессов фотосинтеза и дыхания, прорастания семян, аллелопатических взаимодействий [1, 3]. Они также повышают адаптационные возможности растений в условиях стрессовых воздействий, таких как высокая интенсивность света,

патогенные инфекции, дефицит макро- и микроэлементов, низкие температуры и др. [4]. В значительной степени это обусловлено их антиоксидантной активностью, взаимодействием со свободными радикалами и, как следствие, прерыванием и блокированием цепных процессов свободно-радикального окисления [5]. Эти свойства ФС в поддержании жизнедеятельности проявляются не только в растениях, но и в организме человека, что привлекает внимание исследователей в связи с возможностью их практического применения в фармакологии в качестве веществ-антиоксидантов [6].

Пути биосинтеза ФС в настоящее время хорошо изучены [1]. Установлена важная роль фермента *L*-фенилаланинаммиаклиаза (ФАЛ), катализирующей образование *транс*-коричной кислоты из *L*-фенилаланина. Отмечена его экспрессия в покровных и сосудистых тканях растений, где локализируются флавоноиды и полимеры фенольной природы, выполняющие защитную функцию [7].

Сокращения: ФС — фенольные соединения; ФАЛ — *L*-фенилаланинаммиаклиаза; ДГГ — диплоидный генотип гречихи; ТГГ — тетраплоидный генотип гречихи; МДА — малоновый диальдегид.

Высказывается предположение о том, что фенилпропаноидный путь фенольного метаболизма, по которому образуется большинство веществ фенольной природы, определяет основу устойчивости растений к абиотическим стрессам [4].

К числу экологических факторов, которым растения подвергаются на разных этапах онтогенетического развития, относится температура, в том числе гипотермия [8]. Ее влияние на начальных этапах роста приводит к изменениям физиолого-биохимических процессов на последующих стадиях онтогенеза [9]. Это касается и биосинтеза ФС, что проявляется на уровне активности ферментов их метаболизма и содержания этих вторичных метаболитов, включая фенилпропаноиды и флавоноиды [5, 10]. Сообщалось и о снижении количества этих метаболитов у теплолюбивых культур в условиях холодового стресса [11].

Адаптация растений к действию стрессовых факторов зависит и от уровня плоидности. Например, у тетраплоидных сортов табака устойчивость к холодовому стрессу была выше по сравнению с диплоидными [12]. Повышение уровня плоидности у цитрусовых культур сопровождалось изменениями в их фенотипических и физиологических характеристиках, а также устойчивости к гипотермии [13].

Гречиха посевная, или обыкновенная, представляет собой наиболее известный вид рода *Fagopyrum*, широко возделываемый в качестве крупяной культуры для диетического питания, а также для получения такого соединения фенольной природы как рутин, используемого в качестве препарата-биоантиоксиданта в медицине [14]. Для этой культуры характерно образование различных ФС [15, 16]. Они представлены оксиквонными кислотами (протокатеховая, галловая, ванилиновая), фенилпропаноидами (хлорогеновая, кофейная, феруловая и *n*-кумаровая кислоты) и флавоноидами. К последним относятся флавонолы (кверцетин и его гликозиды, в том числе рутин, кверцитрин и др.), антоцианы и антоцианидины (цианидин и его гликозиды), флаваны (эпигаллокатехин, эпикатехин) и танины, а также образующиеся исключительно у проростков флавоны (ориентин, изоориентин, изовитексин, витексин). К доминирующим соединениям фенольного комплекса гречихи относятся рутин, катехин и эпикатехин, в меньших количествах присутствуют протокатеховая и галловая кислоты, а также витексин и кверцетин, которые в комплексе определяют ее антиоксидантную активность [15].

Следует отметить, что гречиха относится к группе теплолюбивых культур и она восприимчива к действию низких положительных температур, особенно на начальных этапах онтогенеза [8, 17]. Однако до сих пор крайне мало известно об особенностях накопления ФС у генотипов гречихи

посевной с различным уровнем плоидности на стадии проростков, когда они наиболее уязвимы к изменению температурного режима, включая действие низких положительных температур.

Целью работы было исследование действия гипотермии на изменение баланса фенольных соединений в проростках гречихи с различным уровнем плоидности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были проростки гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) диплоидного (ДГГ, $2n = 16$) и тетраплоидного (ТГГ, $4n = 32$) генотипов (сорта Девятка и Большевик 4, соответственно). Семена проращивали в темноте в чашках Петри на смоченной водой фильтровальной бумаге. Через 24 ч материал помещали в рулоны из фильтровальной бумаги (по 15 семян в рулон), которые ставили в пластиковые стаканы с водой (по 7 рулонов в один стакан) и выращивали в камере фитотрона при $+24^{\circ}\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде (5000 люкс) в течение 7 суток. После этого часть растений подвергали низкотемпературному воздействию, помещая их на 1 или 7 суток (кратковременное и длительное воздействие гипотермии, соответственно) в камеру фитотрона с температурой $+5^{\circ}\text{C}$ (при тех же условиях освещения), которая не приводила к их гибели (согласно данным предварительных исследований). В качестве контроля использовали проростки, выращенные в стандартных условиях. Для биохимических исследований надземные органы проростков (гипокотили, семядольные листья) фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C .

Оводненность растительных тканей анализировали после их высушивания до постоянного веса при $+70^{\circ}\text{C}$.

Уровень перекисного окисления липидов в растительных тканях определяли стандартным методом по содержанию МДА, используя реакцию с тиобарбитуровой кислотой [18]. Концентрацию МДА рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции ($1.56 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Количество МДА выражали в мкмоль/г сырой массы.

Фенольные соединения извлекали 96% этанолом из замороженного и измельченного растительного материала в течение 45 мин при 45°C [19]. Экстракты центрифугировали (13500 g, 10 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения ФС. Содержание суммы ФС определяли с реактивом Фолина-Дениса при 725 нм, содержание флавоноидов – с 1% водным раствором хлористого алюминия при 415 нм, содержание фенилпропаноидов – методом прямого спектрофотометрирования растворов при 330 нм [20]. Содержание суммы ФС и содер-

Таблица 1. Морфофизиологические параметры проростков* диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*

| Генотип | Параметры | | | | | |
|---|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | сырой вес, г | | оводненность, % | | ростовые параметры, см | |
| | гипокотиль | семядольные листья | гипокотиль | семядольные листья | длина корня | высота надземных органов |
| Кратковременное воздействие гипотермии | | | | | | |
| Контроль | | | | | | |
| ДГГ | 0.116 ± 0.022 ^C | 0.042 ± 0.003 ^C | 96.06 ± 0.28 ^A | 88.56 ± 0.60 ^A | 9.60 ± 0.82 ^C | 9.04 ± 0.62 ^C |
| ТГГ | 0.140 ± 0.006 ^{AB} | 0.047 ± 0.004 ^B | 97.47 ± 0.50 ^A | 90.27 ± 1.02 ^A | 8.20 ± 0.54 ^D | 8.14 ± 0.42 ^{CD} |
| Опыт | | | | | | |
| ДГГ | 0.103 ± 0.011 ^D | 0.041 ± 0.002 ^C | 95.24 ± 0.28 ^A | 87.98 ± 0.59 ^A | 8.80 ± 0.84 ^{CD} | 8.20 ± 0.27 ^{CD} |
| ТГГ | 0.127 ± 0.004 ^{BC} | 0.039 ± 0.001 ^C | 95.97 ± 0.43 ^A | 88.05 ± 1.51 ^A | 7.90 ± 0.74 ^D | 7.30 ± 0.50 ^D |
| Длительное воздействие гипотермии | | | | | | |
| Контроль | | | | | | |
| ДГГ | 0.130 ± 0.011 ^{AB} | 0.054 ± 0.003 ^A | 96.07 ± 0.07 ^A | 90.06 ± 0.12 ^A | 14.56 ± 1.26 ^A | 13.70 ± 1.41 ^A |
| ТГГ | 0.145 ± 0.009 ^A | 0.054 ± 0.009 ^A | 96.64 ± 1.73 ^A | 91.22 ± 0.62 ^A | 12.60 ± 2.22 ^B | 10.94 ± 0.57 ^B |
| Опыт | | | | | | |
| ДГГ | 0.114 ± 0.009 ^{CD} | 0.048 ± 0.005 ^B | 95.79 ± 0.76 ^A | 85.82 ± 1.47 ^A | 8.40 ± 1.34 ^D | 10.33 ± 0.55 ^B |
| ТГГ | 0.131 ± 0.005 ^{AB} | 0.040 ± 0.001 ^C | 96.89 ± 0.53 ^A | 89.75 ± 0.71 ^A | 8.66 ± 1.32 ^{CD} | 10.49 ± 1.15 ^B |

Примечание. * Данные приведены в расчете на один проросток. Разными латинскими буквами обозначены достоверные различия при $P < 0.05$. Проростки выращивали при $t + 24^{\circ}\text{C}$ (контроль) и подвергали кратковременному (1 сутки) или длительному (7 суток) воздействию низкой положительной температуры (5°C , опыт).

жание флавоноидов выражали в мг-экв. рутина/г сухой массы, а содержание фенолпропаноидов – в мг-экв. кофейной кислоты/г сухой массы.

Антоцианы извлекали 3% раствором HCl в 96% этаноле при постоянном перемешивании в темноте из замороженных в жидком азоте и измельченных гипокотилей проростков гречихи [20]. Через 30 мин гомогенат центрифугировали (11000 g, 10 мин) и в надосадочной жидкости определяли содержание антоцианов методом прямого спектрофотометрирования при 550 нм. Содержание антоцианов выражали в мг-экв. цианидина/г сухой массы.

Для определения активности *L*-фенилаланинаммияклизы (ФАЛ) замороженный материал гомогенизировали в 0.1 М Na-боратном буфере (рН 8.8), содержащем 0.5 мМ ЭДТА и 3 мМ дитиотреитола, с добавлением нерастворимого поливинилпирролидона (50% от веса сырой ткани) [19]. Гомогенат фильтровали, центрифугировали (18000 g, 20 мин) и надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента. Все операции проводили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Активность ФАЛ определяли по образованию из *L*-фенилаланина продукта реакции *транс*-коричной кислоты [19]. Активность ФАЛ выражали в нмоль *транс*-коричной кислоты/мг белка. Ко-

личество белка в пробах определяли методом Бредфорд [21].

В экспериментах использовали трехкратные биологические и трех–четырёхкратные аналитические повторности. В таблице и на графиках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), используя программу Sigma Plot 12.3. Различными латинскими буквами обозначали достоверность различий между средними значениями при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфофизиологические характеристик и проростков гречихи

Определение морфофизиологических параметров проростков двух генотипов гречихи необходимо для оценки их физиологического состояния и реакции на кратковременное и длительное воздействие гипотермии. В большинстве случаев длина корня и высота гипокотиля у проростков ДГГ как контрольных, так и опытных вариантов была выше по сравнению с таковыми у ТГГ (табл. 1). В условиях гипотермии эти показатели снижались. При кратковременном ее воздействии (1 сутки)

длина корней проростков ДГГ уменьшалась на 10% по сравнению с контролем, а у ТГГ не изменялась, тогда как высота гипокотилей уменьшалась у обоих генотипов на 10%. При длительном воздействии гипотермии (7 суток) изменения этих параметров были выражены в значительно большей степени по сравнению с контрольным вариантом: длина корней уменьшалась на 43 и 32% соответственно, у ДГГ и ТГГ, высота гипокотилия снижалась на 25% у ДГГ и сохранялась на уровне контроля у ТГГ.

Сырой вес надземных органов проростков двух генотипов гречихи в условиях гипотермии снижался по сравнению с контролем, тогда как содержание в них воды практически не изменялось (табл. 1). При кратковременном ее воздействии вес гипокотилей у ДГГ и ТГГ уменьшался соответственно на 12 и 10%, а вес семядольных листьев – на 18% у ТГГ и сохранялся на уровне контроля у ДГГ. При длительном воздействии гипотермии вес гипокотилей проростков обоих генотипов гречихи по сравнению с контролем не изменялся, тогда как вес семядольных листьев уменьшался на 12 и 26% у ДГГ и ТГГ, соответственно.

Содержание малонового диальдегида в надземных органах проростков гречихи

Определение содержания МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи, выращиваемых в контрольных и опытных условиях, являлось важной составляющей оценки их реакции на воздействие низкой положительной температуры. Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о более высоком его уровне в семядольных листьях по сравнению с гипокотилиями, а также об изменениях этого показателя при действии гипотермии.

В контрольных условиях содержание МДА у 8-суточных проростков ТГГ было выше по сравнению с ДГГ, и эти различия составляли 400% для гипокотилей и 250% для семядольных листьев. К 14 суткам роста оно повышалось в гипокотилиях ДГГ по сравнению с более ранней стадией онтогенеза на 42%, тогда как у ТГГ понижалось почти на эту же величину (47%). В семядольных листьях этих проростков количество МДА уменьшалось по сравнению с 8-суточными на 32 и 70% у ДГГ и ТГГ соответственно.

В условиях гипотермии содержание МДА в надземных органах проростков обоих генотипов гречихи изменялось. При кратковременном ее воздействии оно увеличивалось в гипокотилиях ДГГ и ТГГ на 38 и 17% соответственно, тогда как в семядольных листьях достоверное повышение анализируемого показателя отмечалось только у ДГГ (на 19%). При длительном воздействии гипотер-

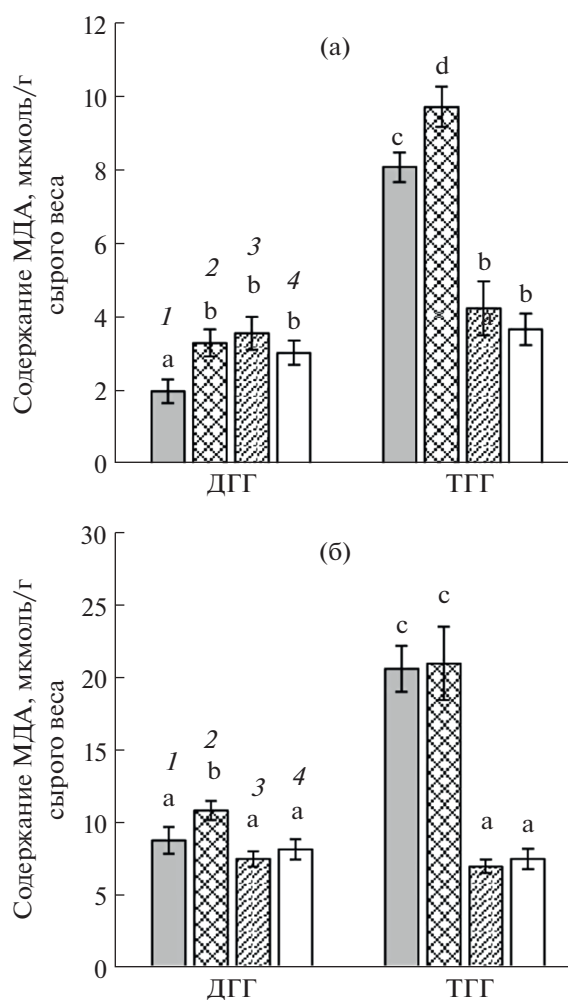


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гипокотилиях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, вариантов 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

мии содержание МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи не изменялось.

Содержание фенольных соединений в надземных органах проростков гречихи

В гипокотилиях проростков гречихи различного возраста, выращиваемых в контрольных условиях, количество ФС было практически равным и несколько выше у ДГГ по сравнению с ТГГ (рис. 2а). В семядольных листьях оно превышало таковое в гипокотилиях: у 8-суточных проростков ДГГ и ТГГ

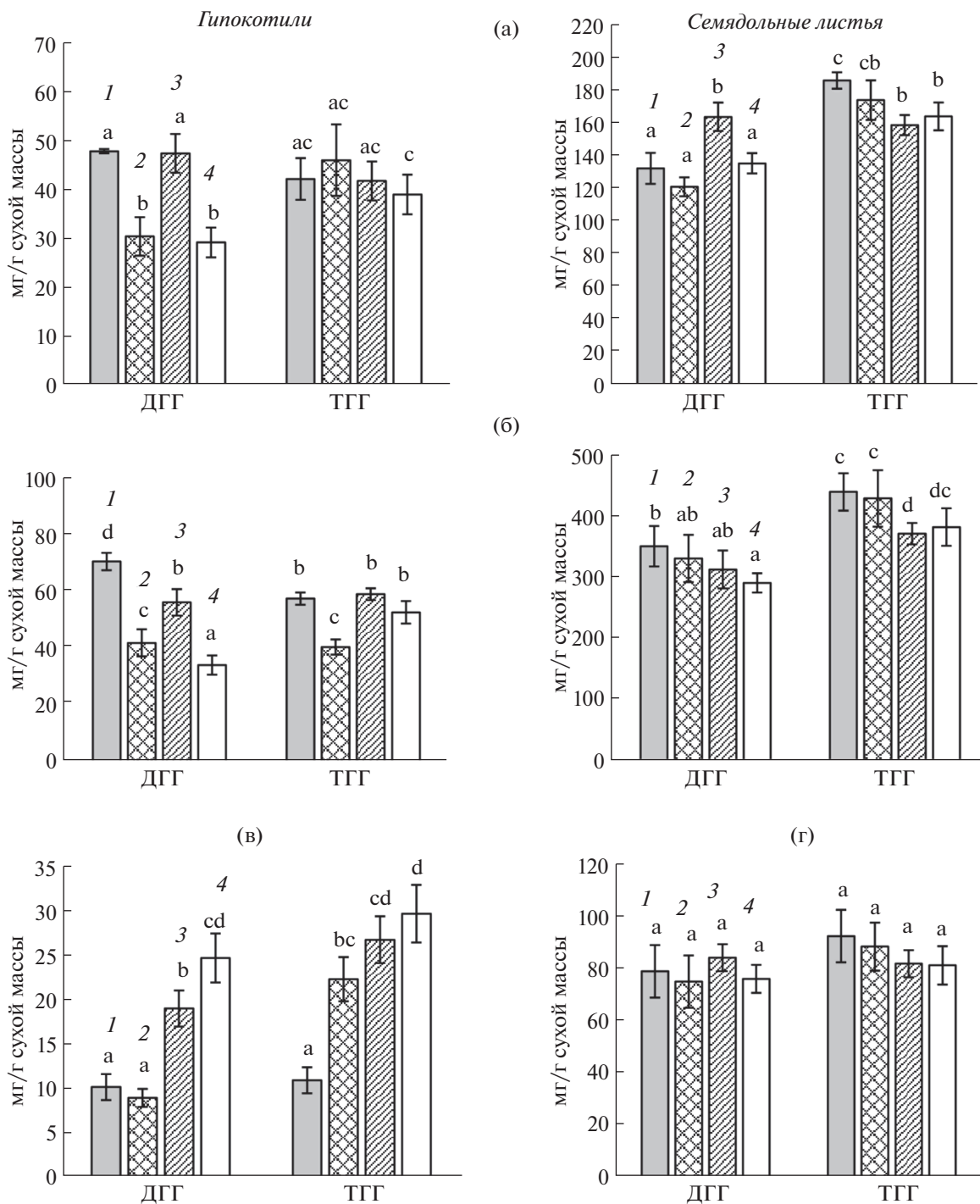


Рис. 2. Содержание суммы фенольных соединений (мг-экв. рутина) (а), фенилпропаноидов (мг-экв. кофейной кислоты) (б), антоцианов (мг-экв. цианидина) (в) и флавоноидов (мг-экв. рутина) (г) в гипокотилиях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, вариантов 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

в 2.5 и 5 раз соответственно, тогда как у 14-суточных – в 3–4 раза.

Кратковременное действие гипотермии в большинстве случаев не приводило к изменениям суммарного содержания ФС в надземных органах проростков обоих генотипов гречихи, за исключением снижения их количества в гипокотелях ДГГ (на 36% по сравнению с контролем). При длительном воздействии гипотермии оно сохранялось на уровне контрольного варианта в надземных органах ТГГ и уменьшалось у ДГГ (как в гипокотелях, так и в семядольных листьях – на 38 и 18% относительно контроля).

Помимо определения суммарного содержания ФС нами было проанализировано накопление основных их классов в надземных органах проростков гречихи.

Определение содержания фенилпропаноидов в гипокотелях проростков гречихи контрольных вариантов показало более высокий их уровень у ДГГ по сравнению с ТГГ (на 20%) на 8 сутки роста и практически равный на 14 сутки (рис. 2б). Иная тенденция отмечена для семядольных листьев, характеризующихся значительно более высоким накоплением фенилпропаноидов, которое в 6–8 раз превышало таковое в гипокотелях. В этом случае у ДГГ их количество было во всех случаях ниже, чем у ТГГ (на 15–20%).

После кратковременного воздействия гипотермии содержание фенилпропаноидов в гипокотелях проростков обоих генотипов гречихи снижалось по сравнению с контролем на 30–40%, тогда как в семядольных листьях достоверных изменений не наблюдалось. Уменьшение их количества отмечалось и после длительного ее воздействия, но только в гипокотелях ДГГ (на 40% относительно контроля). Во всех остальных вариантах (гипокотили ТГГ, семядольные листья ДГГ и ТГГ) достоверных изменений анализируемого показателя не отмечено.

Как следует из представленных на рис. 2в данных, содержание антоцианов у 8-суточных проростков обоих генотипов гречихи контрольных вариантов было практически равным. В дальнейшем (14 суток) оно повышалось (на 46 и 60% у ДГГ и ТГГ соответственно), что приводило к более высокому содержанию антоцианов в гипокотелях ТГГ, которое на 29% превышало таковое у ДГГ.

При кратковременном воздействии гипотермии содержание антоцианов в гипокотелях проростков ДГГ не изменялось, а у ТГГ – повышалось (на 48% по сравнению с контролем). Иная тенденция отмечалась при длительном ее воздействии: их накопление возрастало у ДГГ (на 23% относительно контроля) и не изменялась у ТГГ, что приводило к одинаковому их накоплению у обоих генотипов гречихи.

Определение содержания флавоноидов в семядольных листьях проростков двух генотипов

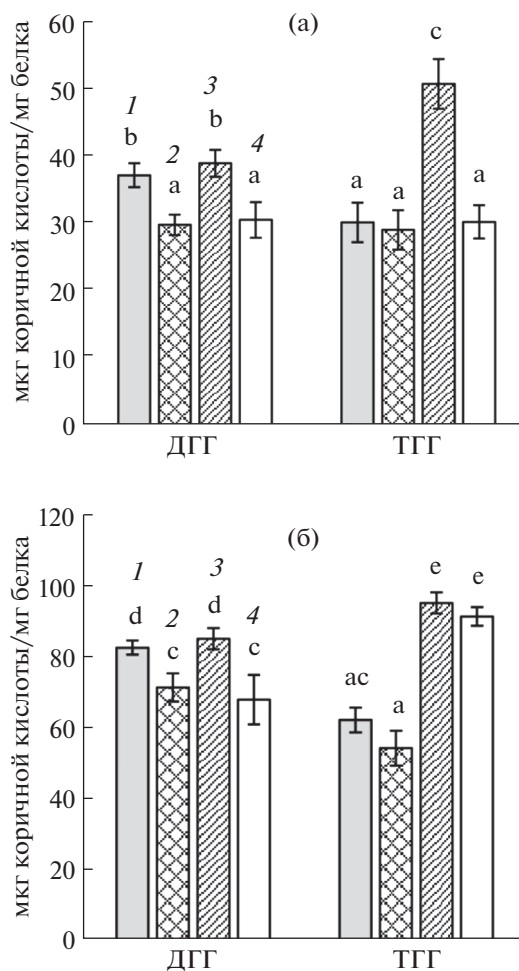


Рис. 3. Активность *L*-фенилаланинаммиаклиазы в гипокотелях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2-кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, вариантов 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

гречихи контрольных вариантов различного возраста (8 и 14 суток) показало практически равный их уровень (рис. 2г). Воздействие гипотермии (как кратковременное, так и длительное) не приводило к достоверным изменениям в количестве флавоноидов.

Активность L-фенилаланинаммиаклиазы в надземных органах проростков гречихи

Определение активности ФАЛ в проростках контрольных вариантов обоих генотипов гречихи показало, что в семядольных листьях она была в

среднем почти в 2 раза выше, чем в гипокотильях (рис. 3). При этом у 8-суточных проростков более высокие значения ФАЛ характерны для надземных органов ДГГ по сравнению с ТГГ, тогда как у 14-суточных — для ТГГ (за исключением семядольных листьев).

При кратковременном воздействии гипотермии активность ФАЛ снижалась в гипокотильях и семядольных листьях проростков ДГГ (на 20 и 14% относительно контроля соответственно) и не изменялась у ТГГ. При длительном ее воздействии у проростков ДГГ тенденция была аналогичной, тогда как у ТГГ активность фермента сохранялась на уровне контроля в семядольных листьях и снижалась в гипокотильях (на 40% относительно контроля).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высшие растения в течение онтогенетического развития могут подвергаться низкотемпературному воздействию, что приводит к изменениям их роста и образования различных метаболитов [8]. К их числу относятся ФС — одни из наиболее распространенных представителей специализированных соединений растительного происхождения, для которых характерна антиоксидантная активность и участие в защите клеток от действия активных форм кислорода, количество которых повышается при стрессовых воздействиях [1, 4, 5]. Несмотря на большой интерес исследователей к изучению этих антиоксидантов, до сих пор данные об изменениях в их накоплении на начальных этапах онтогенетического развития растений, когда они наиболее чувствительны к действию гипотермии, немногочисленны и достаточно противоречивы [11, 16]. Это обусловлено спецификой образования ФС у различных видов растений, распределением их по органам и тканям, воздействием экологических и стрессовых факторов, а также уровнем полиплоидизации [1, 3, 4, 11, 22]. В этом случае растения гречихи, а именно гречихи обыкновенной или посевной, для которой характерна высокая способность к образованию различных ФС, в том числе флавонола рутина — вещества с Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью, представляют уникальный объект для изучения [14]. Важно отметить наличие у этой культуры сортов с различным уровнем плоидности, что позволяет сравнить их ответную реакцию на изменение условий роста, в том числе воздействие гипотермии, и вызывает интерес у исследователей [23].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на ранних этапах онтогенетического развития растения, принадлежащие к одному виду (*F. esculentum*), но с разным уровнем плоидности ($2n$ и $4n$), отличались по морфофизиологическим характеристикам как при выращивании в стан-

дартных условиях, так и при действии гипотермии. Так, у проростков ТГГ скорость роста как подземных, так и надземных органов была ниже таковой у ДГГ. О снижении ростовых параметров при полиплоидизации растений сообщалось и в литературе [24]. Следует также отметить уменьшение биометрических параметров проростков двух генотипов гречихи в условиях гипотермии, как это отмечалось и для других растений [8, 9]. При этом оводненность надземных органов сохранялась на одном уровне у контрольных и опытных вариантов, что может свидетельствовать об отсутствии изменений их водного режима на начальных этапах онтогенеза гречихи. Необходимо также отметить, что длительное воздействие гипотермии приводило к более выраженным изменениям морфометрических параметров проростков двух генотипов гречихи, а также массы их надземных органов по сравнению с кратковременным воздействием. В целом изменения морфофизиологических характеристик у изучаемых генотипов при действии гипотермии имели схожие тенденции, которые были более выражены у ДГГ. О том, что степень морфофизиологической изменчивости у растений определяется их видовой принадлежностью, онтогенетической фазой развития, длительностью и интенсивностью действия температуры сообщалось в литературе [8, 25].

Уровень перекисного окисления липидов, определяемый по содержанию МДА, является важным показателем физиологического состояния растительных тканей и их реакции на изменение условий произрастания, в том числе действия гипотермии [18]. Полученные нами данные свидетельствуют, во-первых, об отличиях в содержании МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи, которое было выше в семядольных листьях, особенно у ТГГ. Во-вторых, о более выраженной их реакции на кратковременное воздействие гипотермии, когда содержание МДА увеличивалось (в большей степени в гипокотильях ТГГ).

Все это подтверждает “зависимость” образования активных форм кислорода в проростках гречихи от уровня их плоидности и длительности воздействия гипотермии, что впервые продемонстрировано нами для этих культур. При схожей тенденции варибельности содержания продуктов перекисного окисления липидов у обоих генотипов в условиях действия гипотермии, изменения у ТГГ были выражены в большей степени относительно ДГГ.

Для растений гречихи характерна высокая способность к накоплению ФС — низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы защиты [4, 14, 15]. Однако крайне мало данных об их образовании на начальных этапах онтогенеза у культур с различным уровнем плоидности, в том

числе в условиях действия низкой положительной температуры. Согласно нашим данным, суммарное содержание ФС в надземных органах проростков гречихи, подвергнутых действию гипотермии, снижалось у ДГГ (особенно при длительном воздействии), тогда как у ТГГ достоверных изменений не отмечено. Это может быть следствием отличий в конститутивном уровне ФС в этих растительных тканях, ингибированием ферментов биосинтеза ФС, катаболизмом этих метаболитов в условиях гипотермии, изменением структуры хлоропластов как основного места биосинтеза ФС в клетках зеленых растений [1, 7, 8]. Следует также отметить, что при длительном воздействии гипотермии такой показатель развития стрессовой реакции как уровень перекисного окисления липидов снижался относительно кратковременного ее воздействия (рис. 1). Это свидетельствует об активации антиоксидантной системы защиты, предотвращающей развитие окислительного стресса в клетках растений [10–12].

Фенилпропаноиды относятся к биогенетически ранним соединениям фенольного метаболизма с высокой окислительно-восстановительной способностью, образование которых в растениях в большинстве случаев повышается при действии стрессовых факторов и способствует формированию устойчивости [1, 10]. Иная тенденция отмечалась в надземных органах проростков двух генотипов гречихи. В условиях гипотермии (как при кратковременном, так и при длительном ее воздействии) содержание фенилпропаноидов снижалось в гипокотилиях, а в семядольных листьях, где их количество было высоким и сохранялось на уровне контроля, эти изменения в большей степени были выражены у ДГГ по сравнению с ТГГ. Тенденция уменьшения этого класса ФС в гипокотилиях гречихи может быть обусловлена изменением скорости их биосинтеза или катаболизма, а также транспортом в другие органы [1, 10]. Следует также отметить различия в накоплении фенилпропаноидов в надземных органах проростков ДГГ и ТГГ, что может быть следствием различно уровня ploидности растений.

Для растений гречихи характерно образование антоцианов, которые на начальных этапах онтогенеза придают красное окрашивание их гипокотилиям [20]. Эти соединения фенольной природы обладают радикал-связывающими свойствами и способны “перехватывать” часть солнечной радиации, тем самым защищая проростки от фотоповреждения [26]. Как следует из наших данных, содержание антоцианов в гипокотилиях повышалось по мере роста проростков гречихи, что в большей степени характерно для ТГГ. В условиях гипотермии в большинстве случаев их количество увеличивалось: у ТГГ – уже при кратковременном воздействии, тогда как у ДГГ – при длительном. Это свидетельствует о том, что при воздей-

ствии гипотермии в гипокотилиях проростков ТГГ происходила быстрая активация биосинтеза антоцианов – ФС с антиоксидантной активностью – в отличие от ДГГ. Интересен и тот факт, что при длительном воздействии низких положительных температур их содержание в гипокотилиях обоих генотипов гречихи достигало одного уровня, что предполагает равную “скорость” их биосинтеза и представляет интерес для последующих исследований. Увеличение накопления антоцианов может сопровождать адаптивную стадию растений к воздействию стрессора, являющуюся важной составляющей процесса формирования неспецифической устойчивости за счет “избыточной” активации метаболизма растений и усиления восстановительных процессов [27].

Флавоноиды представляют собой один из наиболее распространенных в растениях классов соединений фенольной природы, которые накапливаются в листьях, что характерно и для гречихи [1, 15, 20]. Они обладают радикал-связывающими свойствами и способны нейтрализовать активные формы кислорода, количество которых возрастает при действии стрессоров [3, 4]. Полученные нами данные свидетельствуют о “стабильности” биосинтеза флавоноидов в семядольных листьях проростков двух генотипов гречихи и отсутствии влияния низкой положительной температуры на их накопление. Можно предположить, что у фенол-накапливающей культуры гречихи изменения в содержании этих вторичных метаболитов менее выражены в условиях стрессовых воздействий, по сравнению с низко-продукционными культурами [1, 19].

ФАЛ является важным ферментом в биосинтезе ФС, при участии которого *L*-фенилаланин превращается в первое соединение фенольного метаболизма – *транс*-коричную кислоту, служащую предшественником в образовании других ФС [1]. Во многих случаях ее активность рассматривают как показатель биосинтетической способности растительных тканей [7, 19]. В семядольных листьях проростков гречихи отмечена более высокая активность ФАЛ и повышенное накопление ФС по сравнению с таковыми в гипокотилиях, что свидетельствует о взаимосвязи между этими параметрами.

При действии гипотермии отмечались изменения в активности ФАЛ. В надземных органах проростков ДГГ она снижалась, а у проростков ТГГ – сохранялась на уровне контроля при кратковременном ее воздействии. При длительном воздействии гипотермии у проростков ДГГ тенденция была аналогичной, тогда как у ТГГ в семядольных листьях активность фермента сохранялась на уровне контроля, а в гипокотилиях – снижалась. Судя по литературным данным, низкие положительные температуры стабилизируют или активи-

руют ряд транскрипционных факторов у многих культур, тем самым стимулируя наряду с другими ферментами и экспрессию генов ФАЛ [28]. Однако, у проростков гречихи в условиях гипотермии наблюдалась иная тенденция, что может быть связано с отсутствием экспрессии генов ФАЛ и это требует дальнейших исследований.

Таким образом, нами впервые показано, что воздействие гипотермии приводило к изменениям изучаемых показателей у проростков ДГГ. Это проявлялось в ингибировании их роста, повышении уровня ПОЛ и в большинстве случаев уменьшении накопления ФС, что, вероятно обусловлено снижением активности ФАЛ или является следствием катаболизма этих вторичных метаболитов. У проростков ТГГ в условиях гипотермии изменений в количестве ФС не происходило, что коррелировало с активностью ФАЛ, за исключением варианта с длительным ее воздействием, когда активность фермента снижалась, а накопление этих вторичных метаболитов не изменялось. При этом в большинстве случаев ни кратковременное, ни длительное воздействие гипотермии не влияло на накопление отдельных классов ФС в различных органах проростков двух генотипов гречихи, за исключением гипокотилей, в которых содержание фенилпропаноидов снижалось, а антоцианов – увеличивалось, и этот эффект зависел от генотипа гречихи и длительности действия стрессового фактора. Не следует исключать и “зависимость” фенольного метаболизма от стадии онтогенеза растений, поскольку степень “зрелости” растительной ткани соответствует определенной стадии образования вторичных метаболитов [1, 22]. Большое значение имеет влияние на него внешних и внутренних факторов, а именно гипотермии и “дозы гена” (уровня ploидности) [1, 11, 12]. Следовательно, увеличение ploидности у проростков гречихи, возможно, способствует проявлению у них “буферной” функции, стабилизирующей ответные реакции на действие гипотермии, включая баланс ФС. Исходя из этого, полиплоидизацию можно рассматривать как один из путей увеличения биосинтетической способности растений, что особенно актуально для получения вторичных метаболитов, а также как один из подходов для дальнейшей селекционной работы по созданию индуцированных полиплоидов, обладающих повышенным содержанием биологически активных и фармакологически ценных соединений. Выяснение механизмов регуляции биосинтеза ФС в условиях действия низких температур при полиплоидизации растений представляет интерес для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках темы государственного задания Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук № АААА-А19-119041890054-8.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zanprometov M.H.* Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. Москва: Наука. 1993. 272 с.
2. *Pichersky E., Noel J. P., Dudareva N.* Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity // *Science*. 2006. V. 311. P. 808.
3. *Mierziak J., Kostyn K., Kulma A.* Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 16240. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
4. *Naikoo M.I., Dar M.I., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Khan F.A., Naushin F.* Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview // *Plant signaling molecules: role and regulation under stressful environments*. Eds. Khan M.I.R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N. Elsevier. Duxford, United Kingdom. 2019. P. 157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
5. *Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J.* Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer: Cham. 2018. P. 300. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-015>
6. *Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties // *Food Chem*. 2015. V. 183. P. 235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>
7. *Barros J., Dixon R.A.* Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases // *Trends Plant Sci*. 2019. V. 25. P. 66. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
8. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. Москва: Наука. 2007. 54 с.
9. *Vahdati K., Leslie C.* Abiotic stress – plant responses and applications in agriculture. Rijeka: Croatia. 2013. P. 420.
10. *Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B.* Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
11. *Król A., Amarowicz R., Weidner S.* The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves // *Plant Physiol*. 2015. V. 189. P. 97. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.002>
12. *Deng B., Du W., Liu C., Sun W., Tian S., Dong H.* Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? // *Plant Growth Regul*. 2012. V. 66. P. 37. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9626-6>
13. *Oustric J., Morillon R., Luro F., Herbette S., Lourkisti R., Giannettini J., Santini J.* Tetraploid Carrizo citrange

- rootstock (*Citrus sinensis* Osb. *Poncirus trifoliata* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) // *Plant Physiol.* 2017. V. 214. P. 108.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.014>
14. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО "Офорт" СамГМУ. 2004. 1180 с.
15. Kreft M. Buckwheat phenolic metabolites in health and disease // *Nutr. Res. Rev.* 2016. V. 29. P. 30.
<https://doi.org/10.1017/S0954422415000190>
16. Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N.A., Latif M.S.Z., Randhawa M.A. Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review // *J. Agricultural Science.* 2014. V. 152 (3). P. 349.
<https://doi.org/10.1017/S0021859613000166>
17. Фесенко Н.В., Фесенко Н.Н., Романова О.И., Алексеева Е.С., Суворова Г.Н. Теоретические основы селекции. Т. 5. Генофонд и селекция крупяных культур. Гречиха. СПб.: ГНЦ РФ ВИР. 2006. 196 с.
18. Sin'kevich M. S., Naraikina N.V., Trunova T.I. Processes hindering activation of lipid peroxidation in cold-tolerant plants under hypothermia // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 1020.
<https://doi.org/10.1134/S1021443711050232>
19. Olenichenko N.A., Zagoskina N.V. Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. P. 600.
<https://doi.org/10.1007/s10438-005-0109-2>
20. Zagoskina N.V., Kazantseva V.V., Fesenko A.N., Shirokova A.V. Accumulation of phenolic compounds at the initial steps of ontogenesis of *Fagopyrum esculentum* plants that differ in their ploidy levels // *Biol. Bull.* 2018. V. 45. P. 171.
<https://doi.org/10.1134/S1062359018020140>
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
22. Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay Allemand C. Biological activity in plant cells // *Recent Adv. Polyphenol Res.* Eds. Santos-Buelga C., Escobedo-Bailon M., Lattanzio V. Oxford: Wiley-Blackwell. 2010. V. 2. P. 163.
<https://doi.org/10.1002/9781444323375.ch6>
23. Scholes D.R., Paige K.N. Plasticity in ploidy: a generalized response to stress // *Trends in Plant Science.* 2015. V. 20 (3). P. 165.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.007>
24. Wang W., He Y., Cao Z., Deng Z. Induction of tetraploids in *Impatiens walleriana* and characterization of their changes in morphology and resistance to downy mildew // *HortScience.* 2018. V. 53. P. 925.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13093-18>
25. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // *Planta.* 2012. V. 235. P. 1091.
26. Close D. C., Beadle C. L. The ecophysiology of foliar anthocyanin // *Bot. Rev.* 2003. V. 69. P. 149.
27. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем. 2001. 160 с.
28. Guo J., Zhou X., Wang T., Wang G., Cao F. Regulation of flavonoid metabolism in ginkgo leaves in response to different day-night temperature combinations // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 147. P. 133.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.009>