

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КОРНЕЙ
ПШЕНИЦЫ СОРТА САРАТОВСКАЯ 29 ПОД ВЛИЯНИЕМ
ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Юриковой Ольги Евгеньевны

Научный руководитель:

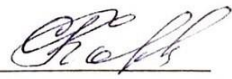
канд. биол. наук


30.05.2023
дата, подпись

М.В. Каневский

Зав. кафедрой:

док. биол. наук, проф.


30.05.2023
дата, подпись

С.А. Коннова

Саратов 2023

Введение. Фенольные соединения в растениях содержатся во многих частях: в корнях, листьях, цветках, проростках, в покровных тканях плодов, и играют важную роль в процессах адаптации, роста, фотосинтеза, дыхания. Синтез полифенолов происходит в митохондриях, пластидах, эндоплазматической сети, иногда в клеточной стенке и вакуолях.

Бактерии PGPR стимулируют рост растений и формируют с ними стойкие ассоциативные отношения, которые несут много полезных функций для растений и являются важными участниками в протекании важных процессов. Микроорганизмы имеют три вида полисахаридов, которые вместе с флавоноидами помогают формировать ассоциацию.

Целью исследования была оценка изменения качественного и количественного состава фенольных соединений в корнях пшеницы сорта Саратовская 29 под влиянием полисахаридов азоспирилл.

Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

1. Оценка морфометрических показателей проростков пшеницы, выращенных в присутствии полисахаридов азоспирилл;
2. Определение содержания фенольных соединений в экстрактах корней проростков пшеницы;
3. Оценка качественного состава фенольных соединений, экстрактов корней проростков пшеницы.

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Семена обрабатывали раствором гипохлоритом натрия и дистиллированной воде, потом сеяли в чашки Петри с ГРМ-агаром, через неделю пересаживали в среду Кнопа. Морфометрические показатели измеряли линейкой. Общее содержание фенольных соединений определялось с помощью реактива Фолина-Чокальтеу и микропланшетном ридере. Качественные показатели фенольных соединений определяли с помощью нескольких методов.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из списка использованных сокращений, введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе

анализа 60 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о фенольных соединениях (общая характеристика, классификация, функции в растениях), PGPR бактериях (представители, ассоциации с растениями), полисахариды бактерии и их участие в формировании ассоциации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе использованы семена пшеницы сорта Саратовская 29, предоставленная кафедрой микробиологии и физиологии растений Саратовского Национального Исследовательского Государственного Университета имени Н.Г. Чернышевского, липополисахариды бактерий *Azospirillum brasilense* SR109 и *A. thiophilum* BV-S, предоставленные лабораторией биохимии Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (ИБФРМ РАН).

Семена пшеницы промывали в разбавленном (1:1) растворе гипохлорита натрия (Торговое название «Белизна») в течение 20 минут, далее семена отмывали в дистиллированной воде 1 раз по 10 минут. Затем переносили в чашки Петри с питательной средой (ГРМ-агар). Для приготовления среды брали 8,4 г питательного сухого агара (в составе очищенный гидролизат кормовых дрожжей 18 г, высушенный агар 11 г, хлорид натрия 6 г), разводили до 200 мл дистиллированной водой в соответствии с инструкцией.

Семена проращивали в термостате при комнатной температуре без освещения в течение 7 суток. После отбирали стерильные проростки и пересаживали их на среду Кнопа для дальнейшего роста при комнатной температуре в ламинаре БМБ-II-«Ламинар-С». Опытные зерновки обрабатывали после стерилизации, перед выкладыванием на твёрдую питательную среду препаратами ЛПС. Для этого в стерильных условиях готовили раствор ЛПС в стерильной воде с концентрацией 0,125 мкг/мл. Стерильные зерновки помещали в этот раствор на 10 минут. Контрольные образцы помещали в стерильную воду.

Для приготовления среды Кнопа на 0,5 л использовали: нитрат кальция 0,5 г, фосфат калия однозамещенный 0,125 г, сульфат магния 0,125 г, хлорид калия

0,0625 г и хлорид железа III 0,00625 г. Каждое вещество растворили отдельно в 40 мл воды. Затем наливали в мерный сосуд приблизительно 300 мл воды, добавляли первый раствор, хорошо размешали и так с каждым следующим, пока все вещества не окажутся в мерном сосуде. Только после этого доливали воду до общего объема 0,5 л. Готовили концентрированный раствор из 0,75 г железного купороса и 0,85 г лимонной кислоты, которая снижала риск выпадения ржавого осадка. Растворили отдельно каждое вещество, а потом смешали оба раствора, доведя объем до 0,25 л. Для приготовления питательной смеси добавляли 2,5 мл этого раствора на 0,5 л раствора Кнопа вместо хлорида железа.

Сравнения морфометрических показателей. Длину корней и стеблей проростков измеряли линейкой, результаты записывали в таблицу и проводили статистическую обработку данных. Затем с помощью скальпеля отрезали от проростков корни, гомогенизировали их отдельно пестиком в фарфоровой ступке до однородной массы вместе с 20 мл этилового спирта 95% концентрации. Растительный материал нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут с момента закипания водно-спиртовой смеси. После окончания смесь фильтровали, в круглодонную колбу и упаривали досуха на роторном вакуумном испарителе Hei-Var Value при 60 °С. После упаривания сухой остаток растворяли 95% спиртом.

Количественное содержание фенольных соединений экстрактов определяли с помощью метода Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси на микропланшетном ридере iMark Microplate Reader на плоскодонном планшете при длине волны 750 нм. В составе реактива содержатся фосфорномолибденовая и фосфорновольфрамовая кислоты, которые в щелочной среде при контакте с фенольными соединениями в экстрактах восстанавливаются и образуют комплексы синего цвета, на образование которых требовалось 2 часа ожидания. Чем ярче окраска, тем больше фенольных соединений содержится в экстракте. Калибровочную кривую

строили по кверцетину. Концентрации стандартных растворов были 0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 мкг/мкл.

Для расчета суммарного содержания фенольных соединений использовались данные с микропланшетного ридера. Содержание внутриклеточных фенольных соединений рассчитывали по формуле:

$$\Phi = (C \cdot V_{\text{экстракта}}) / (m \cdot 1000),$$

где Φ – общее содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты / г сырой биомассы;

C – концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мг-экв галловой кислоты/л;

V экстракта – общий объем экстракта, мл;

m – масса навески, г;

1000 – коэффициент перевода л в мл (объем экстракта).

В контрольном опыте было исследовано 19 проростков. Средняя длина корня составила $5,95 \pm 0,60$ см. Средняя длина побега составила $15,55 \pm 0,78$ см. Среднее количество корней у 1 растения $5,00 \pm 0,25$ шт.

Количество проростков опытной группы, которые были культивированы в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 составило 20 штук. Средняя длина корня составила $6,11 \pm 0,34$ см. Средняя длина побега составила $14,61 \pm 0,50$ см. Среднее количество корней у 1 растения $4,00 \pm 0,32$ шт.

Количество семян опытной группы, которые были обработаны ЛПС *A. thiophilum* BV-S составило 20 штук. Средняя длина корня составила $7,43 \pm 0,35$ см. Средняя длина побега составила $13,41 \pm 0,58$ см. Среднее количество корней у 1 растения $4,00 \pm 0,30$ шт (рисунок 1).

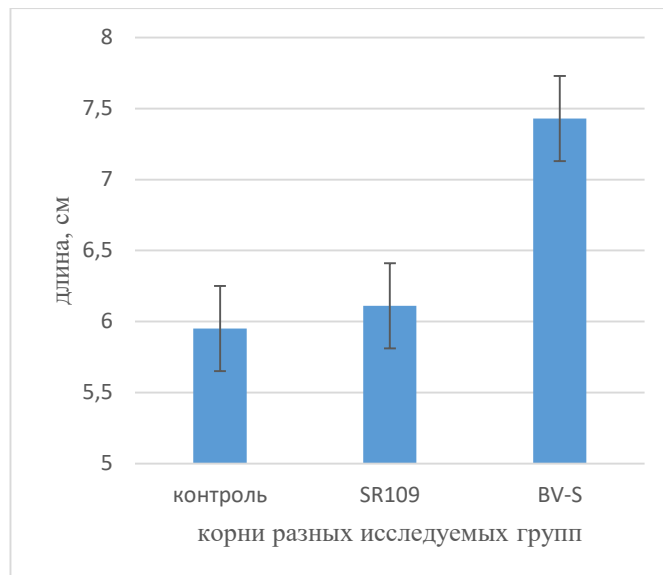


Рисунок 1 – Изменение длины корня Саратовская 29 при инкубировании в присутствии ЛПС различных штаммов азоспирилл

Из полученных результатов можно увидеть, что длина корней, выращенных при инкубации проростков ЛПС штамма *A. thiohyllum* BV-S (7,43 см), достоверно больше чем у контрольной группы (5,95 см) на 20% и группы с использованием штамма ЛПС штамма *A. brasilense* SR109 (6,11 см) на 3%. У контрольной группы длина корня меньше всех (рисунок 2).

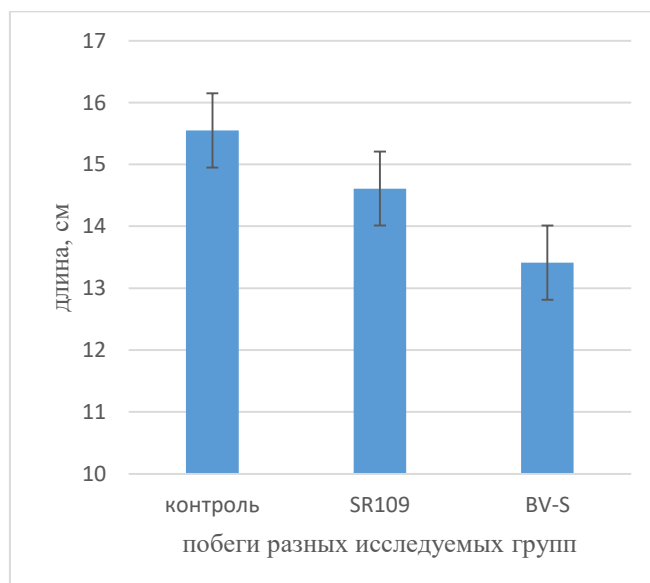


Рисунок 2 – Изменение длины побега Саратовская 29 при инкубировании в присутствии ЛПС различных штаммов азоспирилл

Длина стеблей оказалась больше всего у контрольной группы (15,55 см), чем у групп, выращенных со штаммами BV-S (13,41 см) на 14% и SR109 (14,61 см) на 7%. При этом наблюдалось снижение данного параметра на 14 и 7% соответственно (рисунок 3).

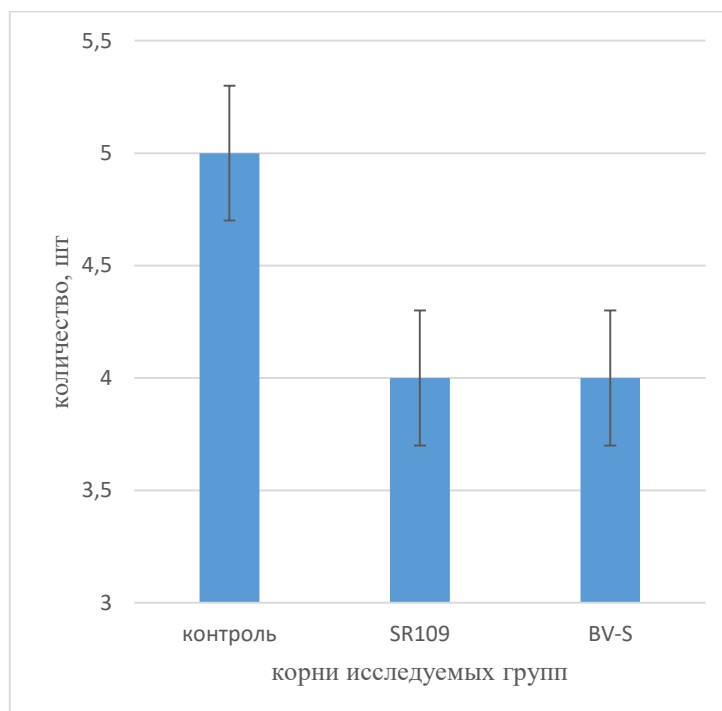


Рисунок 3 – Изменение количества корней пшеницы Саратовская 29 при инкубировании в присутствии ЛПС различных штаммов азоспирилл

Количество корней у всех групп оказалось приблизительно одинаковым: 5 шт. у контрольной; 4 шт. у группы с BV-S; 4 шт. у группы с SR109.

Содержание фенольных соединений в проростках пшеницы сорта Саратовская 29. Для сорта пшеницы Саратовская 29 было выявлено, что содержание фенольных соединений в корнях в пересчёте на кверцетин оказалось больше у групп, обработанных ЛПС бактерий *A. brasilense* SR109 ($4,49 \pm 0,01$ мМ/г сырого веса корней) и *A. thiopilum* BV-S ($2,49 \pm 0,04$ мМ/г сырого веса корней), чем у контрольных образцов ($1,17 \pm 0,01$ мМ/г сырого веса корней) (рисунок 4). Это достоверно совпадает с результатами из литературных источников.

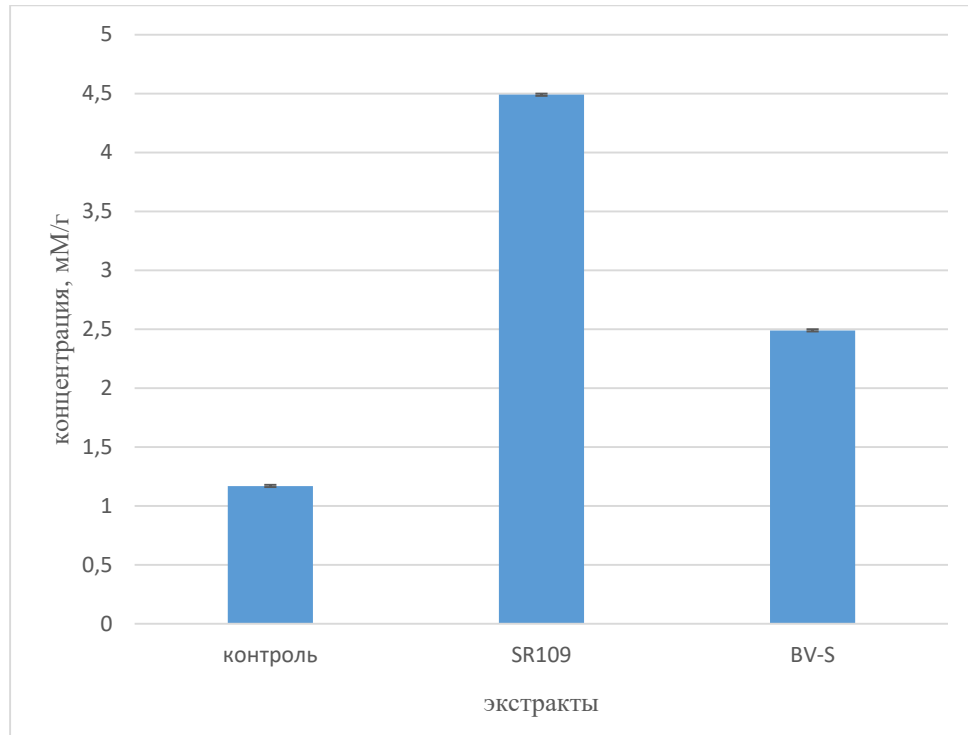


Рисунок 4 – Изменение общего содержания фенольных соединений в проростках пшеницы Саратовская 29 при инкубировании в присутствии ЛПС различных штаммов азоспирилл

Анализируя результаты, можно прийти к выводу, что присутствие ЛПС ассоциативного штамма азоспирилл (*A. brasilense* SR109) приводит к стимуляции синтеза и накоплению фенольных соединений по сравнению с контролем. Показатель возрастает в 3,8 раза. ЛПС *A. thiophilum* BV-S, который не вовлекается в ассоциативные взаимодействия, стимулирует выработку и накопление фенольных соединений в корнях в меньшей степени. По сравнению с контролем показатель достоверно возростал в 2,1 раза.

Состав фенольных соединений корней пшеницы сорта Саратовская 29 под влиянием полисахаридов бактерий. Исходя из литературных данных о присутствии различных фенольных соединений в растениях, нами были выбраны качественные реакции на сапонины, флавоноиды и катехины.

Для определения качественного состава использовали несколько методов. Катехины при взаимодействии с кислым раствором ванилина формируют

красно-малиновое окрашивание. Поэтому для проведения качественной реакции был использован 1% раствор ванилина в $\text{HCl}_{\text{конц}}$. К 1 мл растительного экстракта добавляли 1 мл раствора ванилина в соляной кислоте и оставляли на 30 минут для развития окраски. Положительной считали реакцию, где наблюдалось покраснение раствора.

3- и 5-гидрокси флавонолы взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной (или щавелевой) кислоты, образуя ярко-желтое окрашивание с желтовато-зеленой флуоресценцией (образование батохромного комплекса).

Флавоноиды с 1% спиртовым раствором FeCl_3 дают коричневую (3-ОН-группа) или зеленую (5-ОН-группа) или синюю (3 4 5 ОН-группы) окраски. Для проведения анализа к 1 мл растительного экстракта добавляли 200 мкл 1% спиртового раствора FeCl_3 .

Для определения сапонинов к 1 мл экстракта добавляли 1 мл 10% раствор NaNO_3 и 1 каплю концентрированной H_2SO_4 . Положительной считается реакция, если произошло покраснение раствора.

Таблица 1 – Состав фенольных соединений корней пшеницы сорта Саратовская 29 в образцах со штаммами SR109 и BV-S, в контрольных образцах

Экстракты	Фенольные соединения	Сапонины	Флавоноиды		Катехины
	+ NaNO_3 + H_2SO_4 конц	По Вильсону	+ FeCl_3	+Ванилин в HCl	
SR109	-	++	+	-	
BV-S	+	+	++	+	
Контроль	-	-	+	-	

Обозначения: - означает, что данной группы фенольных соединений нет в образце; + означает присутствие; ++ означает повышенное содержание.

Как можно видеть из таблицы, в экстрактах корней растений, инкубированных с ЛПС штамма SR109, содержатся флавоноиды: метод с хлоридом железа (III) выявил их наличие, а метод Вильсона показал их

повышенное содержание по сравнению с другими образцами. В экстрактах со штаммом BV-S содержатся флавоноиды, катехины и сапонины, то есть все из исследуемых фенольных соединений. Стоит отметить повышенное содержание флавоноидов по методу с хлоридом железа (III). В контроле из всех представленных фенольных соединений были обнаружены только флавоноиды по методу с хлоридом железа (III).

Если делать выводы со стороны используемых четырех методов, то сапонины методом $\text{NaNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ конц выявились только у экстрактов со штаммом BV-S. Флавоноиды по методу Вильсона выявились у экстрактов со штаммом BV-S и SR109 (повышенное содержание). Флавоноиды по методу с хлоридом железа (III) выявились у экстрактов со штаммом BV-S (повышенное содержание), SR109 и контроле, то есть у всех изучаемых образцов. Катехины, которые выявлялись с использованием ванилина, содержатся только в экстрактах со штаммом BV-S, а в других отсутствие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

PGPR бактерии напрямую повышают содержание фенольных соединений в растениях. Выбранные штаммы азоспирилл отличаются своей стратегией взаимодействия с растением: SR109 – ассоциативных штамм, вступающий в ассоциации, а BV-S – свободно живущий. Оба в несколько раз в проведенных экспериментах повысили общее содержание фенольных соединений в проростках пшеницы сорта Саратовская 29. Это дает причины использовать их на практике, например в сельском хозяйстве, для уменьшения содержания токсичных веществ в почве, синтеза фитостимуляторов, подавления патогенных бактерий и грибов.

Необходимо дальнейшее исследование PGPR бактерий и их ассоциаций с растениями, чтобы открывать новые свойства и механизмы влияния друг на друга.

ВЫВОДЫ

1. Для сорта пшеницы Саратовская 29 установлено, что при инкубации проростков в присутствии ЛПС штаммов *A. brasilense* SR 109 и

BV-S было показано отсутствие достоверных отличий по сравнению с контролем в длине побега и количестве корней. Длина корня проростков, инкубированных в присутствии ЛПС штамма *A. thiophilum* BV-S была достоверно выше контроля на 20%

2. Для обеих опытных групп показано достоверное значительное увеличение количества фенольных соединений в экстрактах корней растений. Под действием ЛПС штамма *A. brasilense* SR 109 показатель увеличился в 3,8 раз, а под действием штамма *A. thiophilum* BV-S – в 2,1.

3. В экстрактах корней проростков, выращенных в присутствии ЛПС штамма *A. thiophilum* BV-S, были выявлены сапонины, катехины, флавоноиды. В экстрактах корней проростков, инкубированных в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 и контрольной группы, выявлялись только флавоноиды.

