

## БИОСИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ И СПОСОБЫ ЕГО АКТИВАЦИИ

Е.А. Гумерова<sup>1</sup>, А.Н. Акулов<sup>1,2</sup>, Н.И. Румянцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия, [gumeri@mail.ru](mailto:gumeri@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

**Аннотация.** Исследовали влияние 10 мкМ МеЖ на физиологические характеристики, содержание и состав фенольных соединений (ФС) суспензионной культуры гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* при внесении в среду на 10-е сут культивирования. Общее содержание ФС на 14-е сут увеличивалось в 2 раза. Однако действие МеЖ было избирательным: он не оказывал влияния на синтез фенольных кислот и флавонолов, но значительно стимулировал синтез проантоцианидинов (в 2 раза).

**Ключевые слова:** гречиха татарская, морфогенная суспензионная культура, метилжасмонат, фенольные соединения

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1229-1233

**Введение.** Для гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* характерно высокое содержание фенольных соединений, наиболее представленным из которых является рутин [Horbowicz et al., 2011]. Эта особенность вторичного метаболизма сохраняется при переводе гречихи татарской в культуру *in vitro*. Преимуществами выращивания культур *in vitro* являются контролируемость, воспроизводимость и экологичность процесса, а также возможность направленного изменения синтеза вторичных соединений. Жасмонаты, в том числе МеЖ - сигнальные молекулы растений, которые могут оказывать влияние на регуляцию вторичного метаболизма [Pauwels et al., 2008]. В проведённых нами ранее экспериментах было установлено, что культивирование суспензионной культуры гречихи татарской на среде с 10 мкМ МеЖ в течение всего пассажа (14 сут) активировало синтез и изменяло качественный состав ФС [Гумерова и др., 2015]. Целью настоящей работы было исследовать влияние МеЖ на синтез ФС при кратковременном воздействии на культуру. МеЖ вводили в среду «глотком», на 10-е сут культивирования, когда культура уже набрала достаточную биомассу на выходе из логарифмической фазы роста, имела достаточно высокие ростовые и синтетические характеристики.

**Материалы и методы.** Использовали морфогенную суспензионную культуру (СК) клеток гречихи татарской. МеЖ вносили в среду культивирования на 10-е сут в конечной концентрации в среде 10 мкМ. Экспериментальные данные (прирост биомассы, митотический индекс, жизнеспособность, получение тканевого экстракта, определение в нём общего содержания ФС, ВЭЖХ анализ) получали на 12-е и 14-е сутки культивирования СК аналогично ранее опубликованной статье [Гумерова и др., 2015]. Содержание гидролизуемых и негидролизуемых проантоцианидинов (ПА) оценивали по методу Kitamura с соавторами [2010].

**Результаты и обсуждение.** Согласно литературным данным действие МеЖ в значительной степени зависит от используемой дозы и может оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий (токсический) эффект [Zhang, Xing, 2008]. Выбор концентрации МеЖ - 10 мкМ, был определён на основании результатов предыдущих опытов [Гумерова и др., 2015] с тем, чтобы исключить использование концентраций, подавляющих рост культуры. Нами было показано, что МеЖ в

концентрации 10 мкМ при длительном воздействии в течение пассажа незначительно стимулировал рост культуры. При использовании 10 мкМ МеЖ «глотком» мы также не наблюдали большой разницы на 12-е и 14-е сут между контролем и опытом (рис. 1).

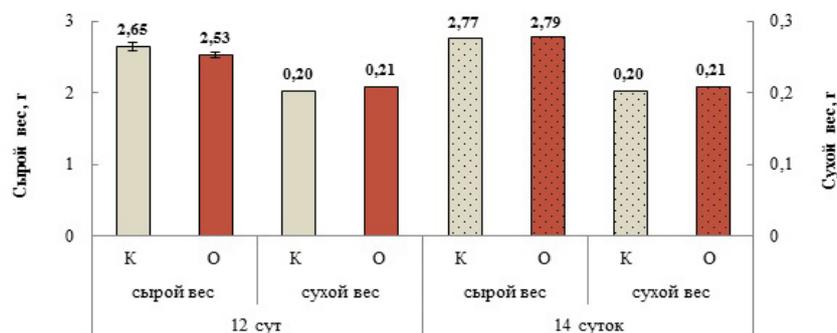


Рис. 1. Биомасса (по сырому и сухому весу) морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

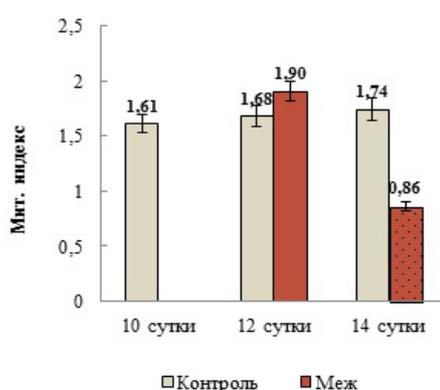


Рис. 2. Митиндекс морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

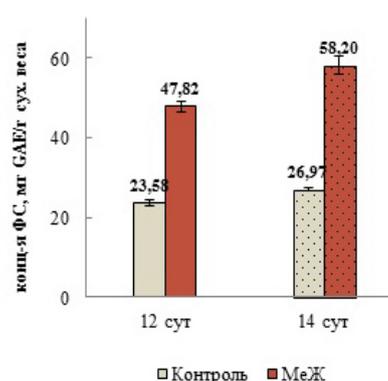


Рис. 3. Содержание ФС в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

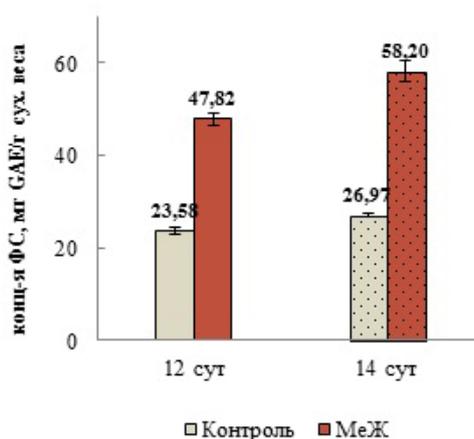


Рис. 4. Содержание рутина в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12 е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

При действии МеЖ митотический индекс СК почти не изменялся на 12-е сутки (2-е сут воздействия), тогда как на 14-е сут (4-е сут воздействия) происходило его резкое снижение (в 2 раза) по сравнению с контролем и более чем в 2 раза по

сравнению со значением на 12-е сут культивирования (рис. 2). Жасмонаты и, в частности, МеЖ задействованы в регуляции различных биологических процессов. Известно, что МеЖ подавляет экспрессию генов клеточного цикла, но активирует экспрессию генов фенилпропаноидного пути биосинтеза ФС [Pauwels et al., 2008]. МеЖ нарушает переход клеток из фазы G2 в фазу M, подавляя активацию генов, контролирующую M-фазу клеточного цикла, и скоординировано запускает работу генов, ответственных за фенилпропаноидный путь. Оба эти процесса происходят независимо один от другого и могут рассматриваться как прямой эффект воздействия МеЖ.

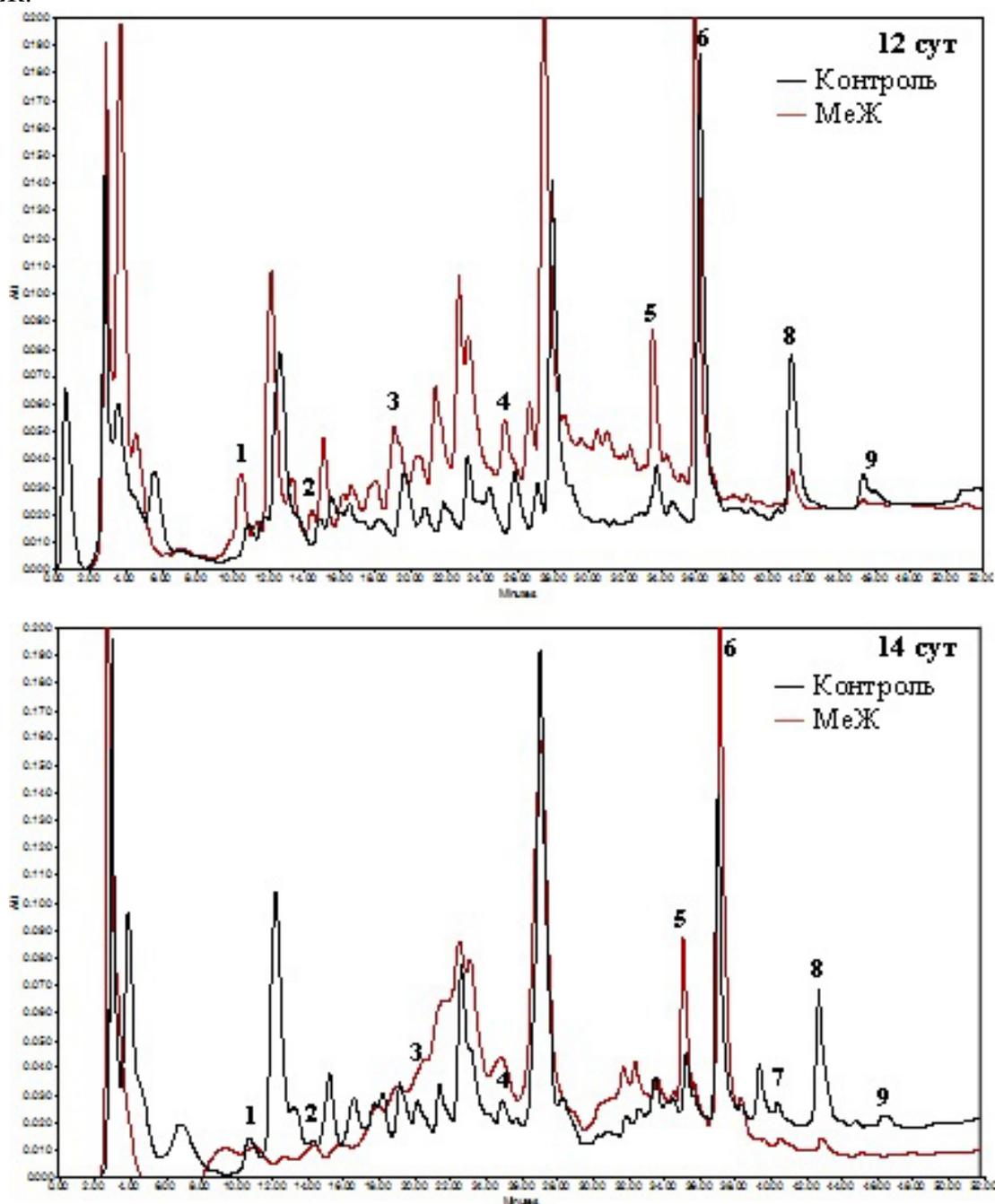
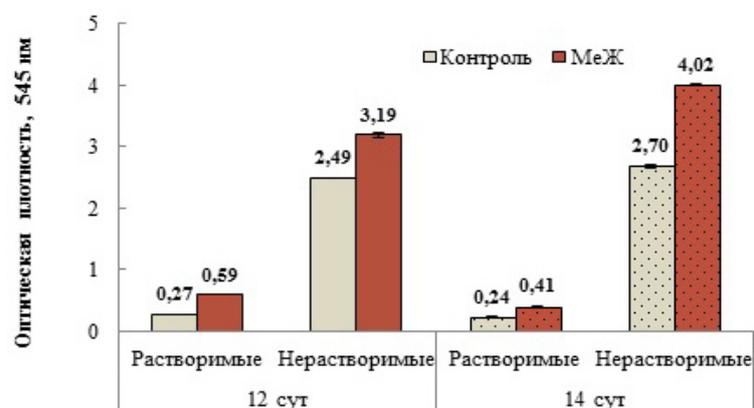


Рис. 5. Хроматограммы ФС морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут: 1 – катехин, 2 – гентизиновая кислота, 3 – эпикатехин, 4 – п-кумаровая кислота, 5 – анисовая кислота, 6 – рутин, 7 – кверцитрин, 8 – коричная кислота, 9 – кверцетин.

Анализ ФС в контрольном варианте за период 12-14-е сут показал незначительное увеличение общего содержания ФС (рис. 3). В варианте с МеЖ содержание ФС к 12-м суткам выросло в 2 раза и оставалось приблизительно на том же уровне до 14-х сут. культивирования. При добавлении МеЖ «глотком» содержание ФС на 14 сут было значительно выше, чем в опыте, когда культуру выращивали на среде с МеЖ в течение пассажа [Гумерова и др., 2015]. Однако этот процесс не сопровождался значительным ростом содержания рутина, преобладающего флавоноида гречихи, содержание которого было рассчитана с помощью ВЭЖХ-анализа (рис. 4). ВЭЖХ анализ позволил идентифицировать следующие ФС: гентизиновую, хлорогеновую, кофейную, *n*-кумаровую, анисовую, коричную кислоты, катехин, эпикатехин, рутин, кверцитрин, нарингенин, кверцетин (рис. 5). При анализе хроматограмм мы не обнаружили значимого увеличения ни одного из пиков ФС в опытном варианте ни на 12-е, ни на 14-е сут культивирования.



**Рис. 6.** Содержание гидролизуемых и негидролизуемых проантоцианидинов в ткани морфогенной суспензионной культуры *F. tataricum* на 12-е и 14-е сут при внесении 10 мкМ МеЖ на 10-е сут.

Исходя из того, что содержание ФС при воздействии МеЖ выросло почти в 2 раза, не затронув в значительной мере содержания ни фенольных кислот, ни флавонолов, мы сделали предположение, что увеличение содержания ФС в метанол-экстрагируемой фракции может происходить за счет активации синтеза других ФС. Показано, что в проростках гречихи культурной МеЖ активирует синтез ПА (флаван-3,4-диолов) [Horbowicz et al., 2011]. Проведенный нами спектрофотометрический анализ показал, что на 12-е сут МеЖ более чем в два раза увеличивает содержание растворимых ПА и на 28% нерастворимых ПА, а на 14-е сут нерастворимых ПА - на 49% (рис. 6). Показано, что в суспензионной культуре преобладают нерастворимые ПА, их содержание почти в 10 раз больше, чем растворимых. На основании полученных результатов можно сделать следующее заключение: МеЖ активирует синтез определённых ФС, преимущественно ПА. Вероятно, это обусловлено увеличением экспрессии ферментов, участвующих в синтезе ПА, таких как, лейкоантоцианидинредуктаза и антоцианидинсинтаза.

#### Литература

Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Влияние метилжасмоната на ростовые характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений // Физиология растений – 2015. – Т. 62, № 2. – С. 212–221.

Horbowicz M., Wiczowski W., Koczkodaj D., Saniewski M. Effects of methyl jasmonate on accumulation of flavonoids in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) // Acta Biol. Hung. – 2011. – V. 62. – P. 265–278.

Kitamura S., Matsuda F., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Yamazaki M., Saito K., Narumi I. Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants // Plant J. – 2010. – V. 62. – P. 549–559.

Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan W., Inzé D., Goossens A. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells // PNAS. – 2008. – V. 105. – P. 1380–1385.

Zhang L., Xing D. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death // Plant Cell Physiol. – 2008. – V. 49. – P. 1092–111.

## THE BIOSYNTHESIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SUSPENSION CULTURE OF TARTARY BUCKWHEAT AND APPROACHES FOR ITS ACTIVATION

E.A. Gumerova<sup>1</sup>, A.N. Akulov<sup>1,2</sup>, N.I. Rumyantseva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, [gumeri@mail.ru](mailto:gumeri@mail.ru)

<sup>2</sup>Kazan University, Kazan, Russia

**Abstract.** The effect of 10 µM methyl jasmonate (MeJA) on physiological characteristics, phenolic content and phenolic composition of suspension culture of tartary buckwheat *Fagopyrum tataricum* was studied after addition to the culture on day 10. The total phenolic content was increased in two times at 14<sup>th</sup> day. However the MeJA action was selective, it did not influenced the synthesis of phenolic acids and flavonols, but greatly enhanced proanthocyanidin synthesis (two fold).

**Keywords:** tartary buckwheat, morphogenic suspension culture, methyl jasmonate, phenolic compounds