

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

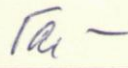
Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Хван Юлии Олеговны

Научный руководитель:
доцент, к.б.н


(подпись, дата)
11.06.21

А. А. Галицкая

Зав. кафедрой биохимии и биофизики.
д.б.н., профессор


(подпись, дата)
11.06.2021

С. А. Коннова

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

В процессе своей жизнедеятельности растения синтезируют огромное количество химических соединений, которые подразделяют на первичные и вторичные метаболиты. Одной из отличительных особенностей всех растений является их способность синтезировать, накапливать и выделять во внешнюю среду полициклические фенольные соединения (ФС).

На сегодняшний день количество ФС растительного происхождения уже свыше нескольких тысяч. Их функции очень разнообразны и это связано с биологической ролью ФС, т.к. они обнаружены во всех органах и тканях растений. Чаще всего их большее количество наблюдается в основных функционирующих органах, таких как листья, цветки, плоды, проростки, а также в покровных тканях, являющихся основным защитным слоем растений.

ФС также имеют важное практическое значение. Свое применение они нашли в пищевой промышленности и медицине, в виде лекарственных препаратов и витаминных добавок.

В настоящее время достигнут значительный прогресс в изучении химической структуры ФС, их биосинтеза, а также локализации и регуляции данного процесса внутри клетки. Но, тем не менее, имеющиеся данные о роли полифенолов в жизнедеятельности высших растений так и остаются не достаточно полными, что связано с их разнообразием и выполняемыми функциями.

До сих пор не ясно, какую роль фенольные соединения играют в защите растений от неблагоприятных факторов окружающей среды. В то же время исследование данной проблемы является весьма актуальным, поскольку многие виды растений в процессе своего развития часто сталкиваются с губительным действием абиотических и биотических факторов. Вместе с тем, прогресс в изучении взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами пошел вперед, но до сих пор данные не позволяют достаточно полно раскрыть механизм влияния ФС на ЛПС ризосферных бактерий.

На сегодняшний день до сих пор остаются неполными сведения, посвященные роли фенольных соединений в защите растений от неблагоприятных факторов окружающей среды. В то же время исследование данной проблемы является весьма **актуальным**, поскольку многие виды растений в процессе своего развития часто сталкиваются с губительным действием абиотических и биотических факторов. Вместе с тем, прогресс в изучении взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами пошел вперед, но до сих пор данные не позволяют достаточно полно раскрыть механизм влияния ФС на ЛПС ризосферных бактерий.

Целью данной работы является количественное определение суммы фенольных соединений в проростках мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести исследование литературных источников, связанных с классификацией, распространением и особенностями ФС различных растений, в т.ч. пшеницы.
2. Сравнить содержание фенольных соединений в надземных и подземных органах проростков пшеницы Саратовская 29.

Бакалаврская работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, которая включает главу «Материалы и методы» и главу с изложением результатов исследований и их обсуждением, заключения и списка цитируемой литературы, содержащего 76 источников. Работа изложена на 48 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и 2 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Обзор литературы

Обзор литературы содержит в себе сведения об общей характеристике фенольных соединений (ФС), экскретируемых растениями в почву, их классификации, химическом строении и выполняемых функциях. В нем рассмотрены количество, спектр и сортовые особенности ФС в модельном объекте исследования – пшенице, а также изменение данных характеристик под действием биотических и абиотических факторов среды. А также были разобраны механизмы формирования симбиотических отношений растений и микроорганизмов и подобраны оптимальные условия для идентификации флавоноидов с использованием метода ВЭЖХ.

Глава 2 Материалы и методы

Основными объектами исследования являлись 5-10 дневные проростки гексаплоидной мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29 (2019год). Предварительно семена проходили стерилизацию 15%-ным гипохлоритом натрия, с последующим промыванием 96% этиловым спиртом и автоклавированной дистиллированной водой. Прорастание семян проходило в Чашках Петри, на пропитанной автоклавированной дистиллированной водой фильтровальной бумаге в течение 3 суток при температуре 27°C, поддерживаемой в термостате.

По истечению 3-х дней проростки переносили на питательный агар для проверки на стерильность и инкубировали в течение 1-х суток. Инфицированные проростки удалялись.

Для набора биомассы 4-х дневные проростки переносились в стерильный пластиковый бокс на смоченную дистиллированной автоклавированной водой вату и хранились так еще 5-6 дней. Условия: температура 23°C, длина светового дня 16 часов.

Полученные 10-дневные проростки извлекали из бокса, отделяли корни и

стебли, помещая их на отдельные чашки Петри. Корни и побеги измельчали до гомогенной массы с помощью ступки и пестика, затем проводили экстракцию 20 мл 70% этилового спирта. Растительную массу нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 40 минут. По окончании, колбам с растительным материалом дали остыть, и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин.

Спиртовые экстракты корней и побегов повторно подвергали центрифугированию на миницентрифуге в эппендорфах на 2 мл. В пробирки на 10 мл вносили 250 мкл экстракта, добавляли к нему 1250 мкл разбавленного в 10 раз реактива Фолина-Чокальтеу. По истечению 3 минут к полученному раствору приливали 1000 мкл Na_2CO_3 (3,75 г на 50 мл H_2O). Пробирки с реакционной смесью интенсивно встряхивали и оставляли на 2 часа при комнатной температуре. В контрольной пробирке растительный экстракт был заменён на 70% этиловый спирт. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длине волны 765 нм. Содержание фенольных соединений выражали в миллиграмм-эквивалентах (мг-экв) галловой кислоты.

Содержание внутриклеточных фенольных соединений в экстрактах рассчитывали по формуле:

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

где Φ – общее содержание внутриклеточных ФС, 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;

$V_{\text{экстракта}}$ – общий объем экстракта, мл;

m – масса навески, г;

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

Глава 3 Результаты и обсуждения

Растения в процессе своей жизнедеятельности способны синтезировать, накапливать и выделять во внешнюю среду полициклические фенольные соединения, в т.ч. флавоноиды. Образование данных соединений напрямую связано с действием абиотических и биотических факторов окружающей среды, оказывающих влияние на растение. Фенольные соединения способны не только выполнять защитную функцию, но и участвовать во многих физиологических процессах самого растительного организма.

При выборе объекта исследования мы опирались на то, что в научной литературе недостаточно сведений о количестве и спектре фенольных соединений, в т.ч. флавоноидов в пшенице. Поэтому в качестве модельного объекта мы решили использовать 10-дневные проростки мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29. Проростки этого возраста характеризуются тем, что в их корнях и побегах заметна наибольшая концентрация ФС. Немаловажным фактом является и то, что пшеница наиболее удобный и коммерчески доступный предмет для анализа.

После того, как нами была проведена экстракция растительного сырья, мы смогли приступить к определению суммы фенольных соединений. Для этого нами была использована методика Фолина-Чокальтеу с модификациями Сингелтона и Росси. Данный метод основан на взаимодействии фенолов, содержащихся в экстрактах, с реактивом Фолина-Чокальтеу. Реактив состоит из солей фосфорновальфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. При взаимодействии с полифенолами и фенолами в щелочной среде данные соли восстанавливаются, образуя окрашенные в синий цвет комплексы, представленные на рисунке 1.

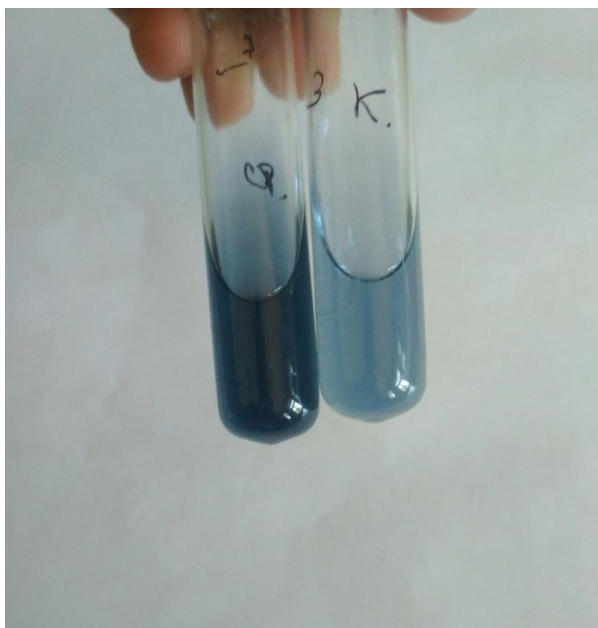


Рисунок 1– Полученные окрашенные комплексы при проверке на наличие
ФС

Интенсивность окраски пропорциональна количеству фенольных соединений в растворе. Исходя из этого, мы можем без подсчётов сказать, что наибольшее содержание данных соединений наблюдается в надземных органах пшеницы, а именно в побегах.

Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 765 нм. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Поглощение фенольных соединений в органах пшеницы
Саратовская 29

Органы проростков	Количество повторностей		
	1	2	3
Побеги	1,335	1,281	1,326
Корни	0,592	0,505	0,525

По полученным данным, приведённым в таблице, можно смело утверждать, что поглощение видимого спектра ФС в побегах выше, нежели чем в корнях.

Содержание фенольных соединений рассчитывали по эквиваленту

галловой кислоты на основании данных калибровочной кривой (рисунок 2).

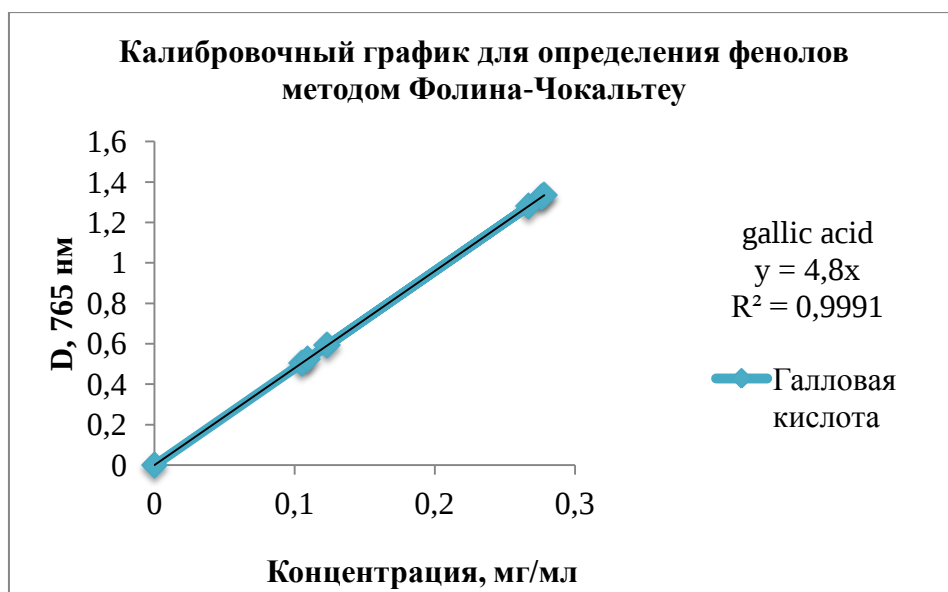


Рисунок 2 – Калибровочный график для определения ФС в корнях и побегах пшеницы Саратовская 29 методом Фолина-Чокальтеу

При определении общей суммы ФС в экстрактах, полученных из корней и побегов пшеницы сорта Саратовская 29, полученный результат был переведён на г сырой биомассы. Количественно это можно оценить на рисунке 25, где приведено общее содержание ФС в пшенице Саратовская 29.

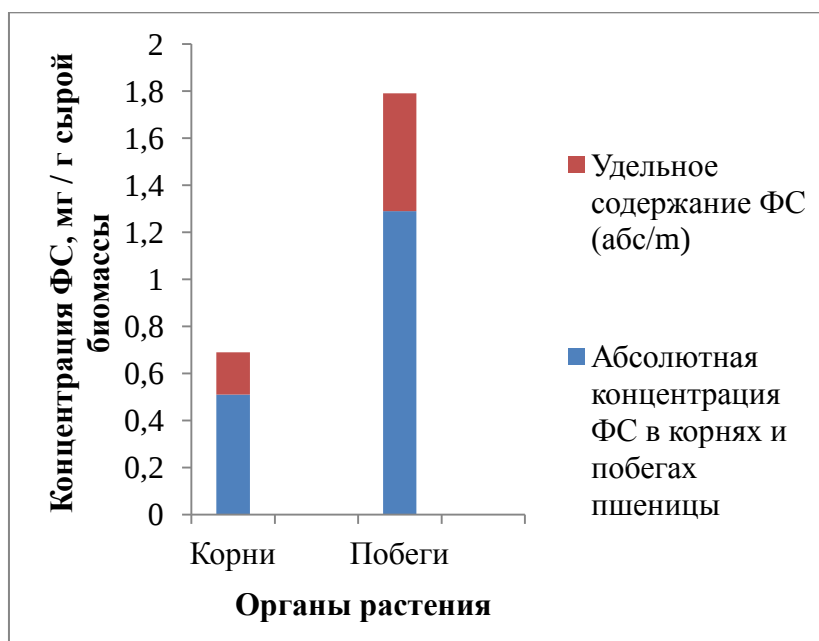


Рисунок 3 – Концентрация ФС в надземных и подземных органах пшеницы Саратовская 29

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературы позволил систематизировать накопленные сведения о химической природе, распространенности и функциях ФС, в том числе флавоноидов. Был изучен вопрос о спектре, содержании и сортовых особенностях данных соединений в пшенице. Как показывают результаты исследования, флавоноиды могут защищать растения от абиотических и биотических факторов окружающей среды, выступая как индикаторы почвы и протекторы растений. Мы смогли охарактеризовать, как взаимодействуют растения и ризосферные микроорганизмы, посредством флавоноидов, какие механизмы при этом используются и какие именно представители бактерий в этом задействованы. Также были подобраны оптимальные условия для определения и идентификации в растениях ФС с помощью метода ВЭЖХ, что может быть интересно в дальнейшем для изучения спектра полифенолов в растениях.

Как показала практика, на сегодняшний день существует не так много литературы, посвященной спектру ФС в пшенице. Именно поэтому перед нами встала задача посмотреть, в каком количестве находятся данные соединения в растении. Исходя из результатов следует, что наибольшее содержание ФС – 1,29 мг /г сырой биомассы - приходится на побеги 10-дневных проростков пшеницы, что вполне сопоставимо с данными литературных источников. В корнях было обнаружено 0, 51 мг/г сырой биомассы, что является относительно неплохим результатом, ссылаясь на концентрации других представителей однодольных растений.

Несмотря на полученные данные, проблема изучения ФС в пшенице остается открытой и в нашей работе мы лишь положили начало для последующих исследований в этом направлении.

