

*На правах рукописи*



Макеева Инна Юрьевна

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ *SOLANUM TUBEROSUM*  
НА ДЕЙСТВИЕ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ**

Специальность: 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре ботаники, физиологии и биохимии растений ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Научный руководитель: **Пузина Тамара Ивановна**,  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой ботаники, физиологии  
и биохимии растений ФГБОУ ВО «Орловский  
государственный университет имени  
И.С. Тургенева»

Официальные оппоненты: **Хрянин Виктор Николаевич**,  
доктор биологических наук, профессор  
кафедры общей биологии и биохимии  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный  
университет»

**Музафаров Евгений Назибович**,  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО  
«Тульский государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт физиологии  
растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук (ИФР РАН)

Защита состоится 10.10.2017 г. в 13<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета Д 220.043.08 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева», по адресу: 127550, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел/факс: 8 (499) 976-21-84.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета [www.timacad.ru](http://www.timacad.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
доктор сельскохозяйственных наук, профессор



С.Л. Белопухов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Одним из актуальных направлений современной физиологии растений является изучение физиолого-биохимической роли вторичных метаболитов в растительном организме (Носов, 2005; Pan et al., 2012; Титова и др., 2015). Фенольные соединения являются наиболее многочисленным классом вторичных метаболитов (Запромётов, 1993; 1996). Долгое время считали, что они обладают только ингибиторными свойствами (Rice, 1974; Wolf et al., 1976; Гродзинский и др., 1987), однако за последние десятилетия представления в этой области претерпели кардинальные изменения (Lattanzio et al., 2008; Волынец, 2013; Cheynier et al., 2013; Загоскина, 2016). Показано, что фенольные соединения могут оказывать стимулирующее действие на рост и органообразование (Кефели, 1997; Фенольные ..., 2015). При этом надо отметить, что функции их отдельных представителей изучены в разной степени. Наибольшее внимание исследователи уделяют изучению антиоксидантных свойств флавоноидов, которые активно используются в медицине и фармакологии (Terao et al., 1994; Andersen, Markham, 2005; Музафаров и др., 2010; Brunetti et al., 2011; Куркина, 2012; Тараховский и др., 2013). Функции другой многочисленной группы – фенилпропаноидов, в состав которых входят гидроксикоричные кислоты, изучены крайне мало (Dixon, Paiva 1995; Куркин, 1996, 2015). Это касается не только оптимальных условий среды, но и действия стрессоров. В последнее время отечественные исследователи используют препарат Циркон, синтезированный на основе смеси гидроксикоричных кислот (Малёванная, Пермитина, 2005; Серёгина, 2007, 2008; Мишина, 2011; Булдаков, 2014; Чмелёва и др., 2014, 2015), что не позволяет выявить участие отдельных представителей, в том числе, кофейной кислоты в регуляции физиолого-биохимических процессов. Известно, что большинство гидроксикоричных кислот в растениях находятся в связанном состоянии, тогда как кофейная кислота обнаружена и в свободном состоянии (Conkerton, Chapital, 1983; IARC, 1993; Бахтенко, Курапов, 2008). В литературе не найдены сведения о реакции гормональной системы растения на действие кофейной кислоты. Данные же по действию препарата Циркон на содержание фитогормонов малочисленны и противоречивы (Серёгина, 2007; Пузина и др., 2010). Что касается участия кофейной кислоты в регуляции работы антиоксидантной системы растения, то имеются единичные исследования, в которых рассматриваются лишь её отдельные компоненты (Klein et al., 2013; Часов, Миннибаева, 2014; Wan et al., 2015). В большинстве публикаций, посвященных участию гидроксикоричных кислот в формировании устойчивости растений, изучается действие препарата Циркон (Малёванная, Пермитина, 2005; Будыкина и др., 2007; Упадышева, Упадышев, 2013; Чмелёва и др., 2015) или комплекса фенилпропаноидов, выделенных из растений (Волкова и др., 2013; 2014), что не позволяет выявить физиологический механизм действия именно кофейной кислоты. Имеющиеся в литературе работы, касающиеся действия кофейной кислоты на ростовую активность органов растений (ячмень, фасоль, соя, огурец), свидетельствуют о видоспецифичности (Волынец, Башко, 2010; Klein et al., 2013; Wan et al., 2015). При этом в большинстве исследований показано положительное влияние смеси

гидроксикоричных кислот (препарат Циркон) на ростовые показатели растений и их продуктивность (Прусакова и др., 2010; Шаповал и др., 2011).

Данное исследование проведено на картофеле – одной из хозяйственно-ценных культур. Для растений картофеля на первых этапах вегетации губительными являются весенние заморозки ( $-1^{\circ}\text{C}$  –  $-2^{\circ}\text{C}$ ) (Гупало, Гончарик, 1971). Вместе с тем, отсутствуют сведения о влиянии гидроксикоричных кислот на растения картофеля в условиях гипотермии.

**Цель** настоящей работы состояла в изучении физиолого-биохимических особенностей действия кофейной кислоты у растений картофеля в оптимальных условиях и при гипотермии.

В соответствии с заданной целью были поставлены следующие **экспериментальные задачи**:

- изучить влияние кофейной кислоты на содержание фитогормонов;
- исследовать действие кофейной кислоты на активность антиоксидантных ферментов и содержание низкомолекулярных антиоксидантов в оптимальных условиях и при действии гипотермии;
- выявить влияние кофейной кислоты на реакции перекисного окисления липидов и выход электролитов через мембраны в оптимальных условиях и при действии стрессора;
- определить участие кофейной кислоты в регуляции фотосинтетической активности, интенсивности дыхания и водного режима растений;
- изучить действие кофейной кислоты на ростовые реакции и продуктивность растений картофеля.

**Положения выносимые на защиту:**

1. Кофейная кислота оказывает неоднозначное действие на содержание фитогормонов (ауксины и гиббереллины).
2. Кофейная кислота обладает антиоксидантным действием, снижая реакции ПОЛ, уменьшая утечку электролитов на фоне активизации работы высоко- и низкомолекулярной антиоксидантной системы.
3. Кофейная кислота (0.1 мМ) влияет на фотосинтетическую деятельность растений, процесс дыхания, водоотдачу листьев. Неоднозначно действует на ростовые показатели органов растений картофеля, способствует столоно- и клубнеобразованию, повышает продуктивность.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование действия кофейной кислоты на физиолого-биохимические процессы растений картофеля. Показана специфика влияния кофейной кислоты на содержание ауксинов и гиббереллинов. На основании мониторинга процессов ПОЛ, определения утечки электролитов через мембраны, изучения активности ферментов антиоксидантной защиты и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в оптимальных и стрессовых условиях установлено, что кофейная кислота обладает антиоксидантными свойствами.

Выявлены особенности действия кофейной кислоты на фотосинтетическую активность картофеля, процесс дыхания, водоудерживающую способность листьев в оптимальных условиях и при действии гипотермии. Установлено неоднозначное влияние кофейной кислоты на ростовые реакции растений

картофеля и анатомические показатели клубней. Впервые показан стимулирующий эффект кофейной кислоты на процесс столоно- и клубнеобразования, продуктивность растений картофеля.

**Научно-практическая значимость.** Установленные закономерности действия кофейной кислоты на физиолого-биохимические процессы растений картофеля в оптимальных условиях и при гипотермии развивают представления о роли фенольных соединений (гидроксикоричных кислот) в растительном организме. Результаты исследования, касающиеся действия кофейной кислоты на рост корневой системы, процесс столоно- и клубнеобразования, могут быть использованы в биотехнологии при микроклональном размножении картофеля. Полученные в работе данные могут быть полезны для чтения лекций и проведения семинаров по физиологии и биохимии растений, вторичному метаболизму, устойчивости растений, экологической физиологии растений.

**Апробация работы.** Результаты данной работы были представлены на VIII, IX Международных симпозиумах «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012, 2015), XXI и XXII Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014, 2015» (Москва 2014, 2015), Международной научной конференции «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 135-летию со дня рождения профессора В.Н.Хитрово «Актуальность идей В.Н.Хитрово в исследовании биоразнообразия России» и Круглом столе «Продукционный процесс растений и его регуляция» в честь 110-летия со дня рождения профессора С.И.Ефремова (Орел, 2014), на VIII Съезде ОФР России в рамках Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2015), Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Повышение эффективности сельскохозяйственной науки в современных условиях» (Орёл, 2015), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной биологии растений» (Москва, 2015), Всероссийской научной конференции «Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений» (Саранск, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016), Международной научной конференции «Актуальные проблемы естественно-научного образования, защиты окружающей среды и здоровья человека» (Орел, 2016), 3rd International Conference «Plant Nutrition, Growth & Environment Interactions» (Vienna, Austria, 2017).

Исследования проводились в рамках планов НИР кафедры ботаники, физиологии и биохимии растений Орловского государственного университета имени И.С.Тургенева (2013-2015 гг.), а также в рамках госзадания Министерства

образования и науки РФ (регистрационный номер 2014/369) проект № 1373 "Выявление механизмов адаптиогенеза и путей его регуляции на различных уровнях организации споровых и цветковых растений» (2014-2016 гг.).

**Публикации.** По теме диссертационного исследования было опубликовано 20 печатных работ, включая 14 статей, в том числе 6 в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, из них 1 статья в издании, включенном в базу данных Agris.

**Структура и объем и работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, а также приложения. Материалы диссертации изложены на 122 страницах, содержат 40 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 224 источника, в том числе 63 зарубежных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Глава 1. Участие гидроксикоричных кислот в регуляции физиолого-биохимических процессов в растительном организме (обзор литературы)**

Рассматривается место гидроксикоричных кислот среди вторичных метаболитов, даётся их общая характеристика, проанализированы сведения об их влиянии на физиолого-биохимические процессы в растениях.

### **Глава 2. Роль фенольных соединений в адаптации растений к стрессовым условиям (обзор литературы)**

Описано влияние фенольных соединений на устойчивость растений в условиях действия абиотических и биотических стрессоров.

### **Глава 3. Объект и методы исследования**

*Объект исследования* – растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Жуковский ранний селекции ВНИИ КХ (Коренёво, Россия).

*Условия проведения опытов.* Вегетационные опыты проводили в условиях вегетационного домика на базе агробиостанции, лабораторные – в лаборатории «Регуляция роста и развития растений» кафедры ботаники, физиологии и биохимии растений Орловского государственного университета имени И.С.Тургенева. Для *почвенной культуры* использовали серую лесную среднесуглинистую почву. В сосуде с 10 кг почвы выращивали одно растение. В период закладки опытов в почву вносили оптимальные количества азота, фосфора и калия, соответственно 230, 70, 310 мг элемента на кг почвы. В лабораторных условиях клубни картофеля проращивали в контейнерах с влажными опилками вначале в темноте, а после появления всходов на поверхности субстрата при температуре 20±2°C.

*Варианты опыта* включали опрыскивание растений 0.1 мМ раствором *кофейной кислоты* (Sigma, США) из расчета 50 мл на растение через 15 суток после появления всходов. Используемая концентрация подобрана в

предварительных экспериментах по физиологическим показателям (ростовые реакции, работа антиоксидантной системы). Контрольные растения опрыскивали водой. *Гипотермию* создавали, помещая контейнеры с 21-дневными побегами возобновления в низкотемпературный шкаф Т25/01 (Россия) на 2 часа при температуре  $-2^{\circ}\text{C}$ , имитирующей заморозки.

*Отбор проб.* Анализировали средние пробы 21-дневных побегов возобновления и их придаточных корней (лабораторные опыты); листьев 7-го яруса срединной формации в фазе бутонизации, а также надземных и подземных органов картофеля в фазе бутонизации и цветения, клубней – в конце вегетации растений (вегетационные опыты).

*Анализ фитогормонов* ауксинов и гиббереллинов в листьях проводили методом биологической пробы. В качестве биотеста на ауксины использовали отрезки колеоптилей (зона растяжения) озимой пшеницы сорта Московская 39. Для гиббереллинов биотестом служили проростки карликового гороха сорта Шустрик (ВНИИ ЗБК, Орёл). Содержание изученных фитогормонов рассчитывали по калибровочным кривым, построенным: для ИУК (Serva, Германия) и для гиббереллина  $\text{GA}_3$  (Phylaxia, Венгрия), и выражали соответственно в мкг-экв ИУК/г сухой массы и мкг-экв  $\text{GA}_3$ /г сухой массы.

*Активность каталазы* определяли по количеству выделяющегося кислорода с последующим пересчетом на количество пероксида водорода, разлагающегося каталазой; *активность пероксидазы* – по времени образования синей окраски в результате окисления бензидина (Ермаков и др., 1987); *активность супероксиддисмутазы* – по реакции восстановления нитросинего тетразолия, запускаемой рибофлавином (Beauchamp, Fridovich, 1971). *Содержание пероксида водорода* определяли по методу, основанному на образовании окрашенного комплекса пероксида титана (Kumar, Knowles, 1993). *Содержание пролина* определяли в кислой среде с помощью нингидринового реактива (Bates et al., 1973). *Содержание гидроперекисей* жирных кислот липидов оценивали по реакции взаимодействия их с роданистым аммонием (Романова, Стальная, 1977); *содержание малонового диальдегида* – по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (Лукаткин, Голованова, 1988). *Проницаемость клеточных мембран* определяли по выходу электролитов на кондуктометре «Эксперт 002» («Эконикс-Эксперт», Россия) с последующим расчетом коэффициента повреждаемости мембран (Лукаткин и др., 2003).

*Содержание пигментов* определяли в 80%-ном ацетоне на фотометре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия); *фотохимическую активность изолированных хлоропластов* – по количеству восстановленного на свету феррицианида калия (Гавриленко, Жигалова, 2003); *чистую продуктивность фотосинтеза* – методом А.А. Ничипоровича в период между фазами бутонизации и цветения.

*Содержание сахарозы* определяли химическим методом с использованием резорцинового реактива (Туркина, Соколова, 1972).

*Интенсивность дыхания* оценивали по количеству выделяющегося  $\text{CO}_2$  в сосудах для газообмена («Физприбор», Россия).

*Водоудерживающую способность* листьев определяли по проценту потери воды от исходной массы. Для этого листья выдерживали в эксикаторе над серной кислотой в течение 1 часа (Пустовойтова, Бородина, 1981).

*Ростовую активность* (относительную скорость роста) высоты побегов и ярусности рассчитывали, используя формулу:  $R_{акт} = \frac{a_2 - a_1}{t \cdot a_1} \cdot 100\%$ , где  $a_1$  – величина

ростового показателя при первом измерении,  $a_2$  – при втором измерении,  $t$  – время в сутках. *Площадь листьев* определяли, используя полярный планиметр, *объём корневой системы* – по методу Сабина, Колосова (Третьяков, 1990), *массу органов* картофеля – путем взвешивания на торсионных (ВТ-500, Россия) и технических весах (РН-3Ц13УМ, Россия). *Толщину феллемы* (пробки) и размеры клеток перимедулярной зоны клубня измеряли с помощью окулярного микрометра МОВ-1-15<sup>x</sup> на микроскопе Биолам («ЛМО», Россия).

*Продуктивность растений* в почвенной культуре учитывали путем взвешивания клубней в каждом сосуде (10 биологических повторностей).

В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические из 5-10 биологических повторностей и их стандартные ошибки. Аналитическая повторность 5-кратная. Достоверность результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента, считая достоверными различия при уровне доверительной вероятности выше 0.95 (Лакин, 1990).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 4. Действие кофейной кислоты на физиолого-биохимические процессы *Solanum tuberosum* в оптимальных условиях и при гипотермии

#### Влияние на содержание фитогормонов ауксинов и гиббереллинов

Определение содержания эндогенных фитогормонов имеет первостепенную важность в связи с их регуляторной ролью и поэтому представляет особый теоретический и практический интерес. При обогащении растений картофеля кофейной кислотой отмечалось возрастание количества ИУК в листьях на 36% (рис. 1а). Увеличение ИУК возможно связано с ингибированием кофейной



Рисунок 1 - Влияние кофейной кислоты на содержание фитогормонов в листьях. а) содержание ауксинов, б) содержание гиббереллинов.



кислотой активности ИУК-оксидазы. В ранних работах было показано, что фенольные соединения могут выполнять протекторную функцию при окислении ИУК ауксиноксидазой (Witham, Gentile, 1961; Wolf et al., 1976; Баранов, 1979). Иная картина выявлена в действии кофейной кислоты на содержание гибберелловой кислоты, а именно, уровень ГА<sub>3</sub> не отличался от контрольного варианта (рис. 1б). Такой же эффект был получен в исследованиях (Пузина и др., 2010), проведенных с препаратом Циркон (смесь гидроксикоричных кислот) на картофеле сорта Удача. Вместе с тем, у растений яровой пшеницы Циркон вызывал увеличение активности данной группы фитогормонов (Серегина, 2007). Причины отсутствия реакции гиббереллинов на обработку растений картофеля кофейной кислотой требуют дальнейших исследований.

### Действие на антиоксидантную систему

Антиоксидантная система, нейтрализующая активные формы кислорода и сохраняющая структурно-функциональное состояние клеточных мембран, наряду с фитогормонами, занимает важное место в адаптации растений к стрессовым условиям (Лукаткин, 2002; Синькевич, 2006; Трунова, 2007).

Результаты экспериментов показали, что в оптимальных условиях кофейная кислота активизировала как работу антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и пероксидазы (рис. 2), так и накопление низкомолекулярных антиоксидантов – пролина и каротиноидов (рис. 3), которые благодаря своему строению могут тушить активные формы кислорода (Полесская, 2007; Радюкина и др., 2008).

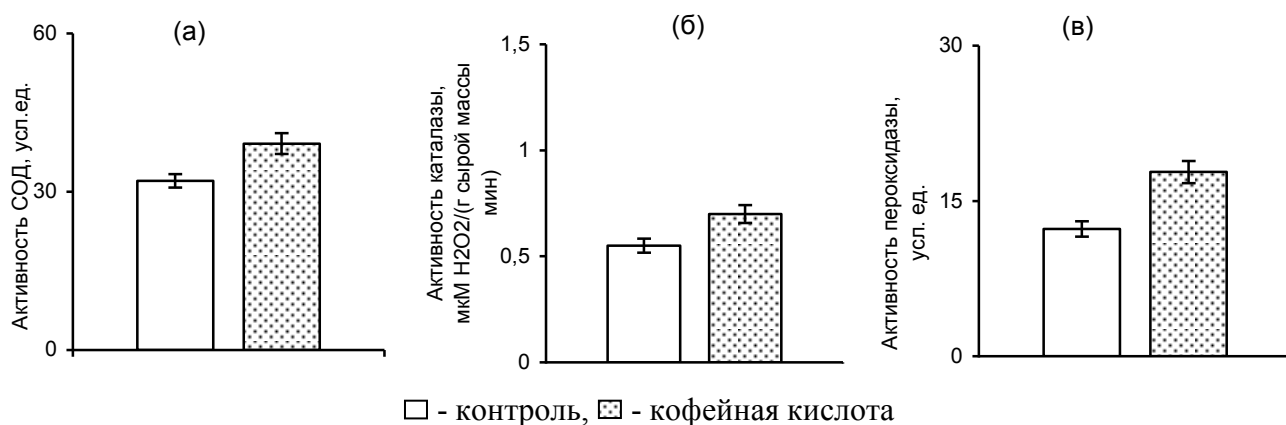


Рисунок 2 – Действие кофейной кислоты на активность антиоксидантных ферментов в оптимальных условиях.

Более чувствительными к обогащению растений кофейной кислотой были активность пероксидазы и содержание каротиноидов. Повышение активности ферментов возможно связано с увеличением содержания эндогенных ауксинов, которые, как известно, участвуют в экспрессии генов антиоксидантных ферментов (Guan, Scandalios, 2002). Имеются сведения (Каташов, Хрянин, 2014), что и экзогенная ИУК приводит к увеличению активности пероксидазы в растениях рапса.

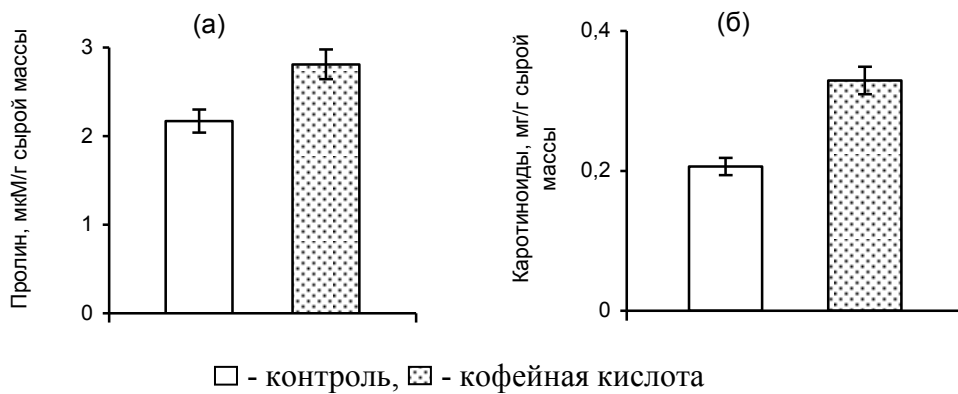


Рисунок 3 – Влияние кофейной кислоты на содержание низкомолекулярных антиоксидантов.

Мониторинг реакций ПОЛ по начальному и конечному продуктам показал отсутствие эффекта в действии кофейной кислоты на содержание гидроперекисей жирных кислот, тогда как количество малонового диальдегида в листьях растений значительно снизилось (рис.4).

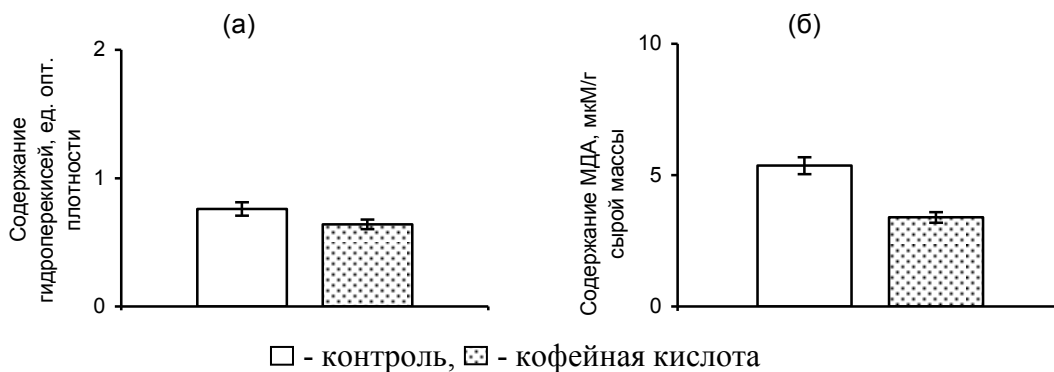
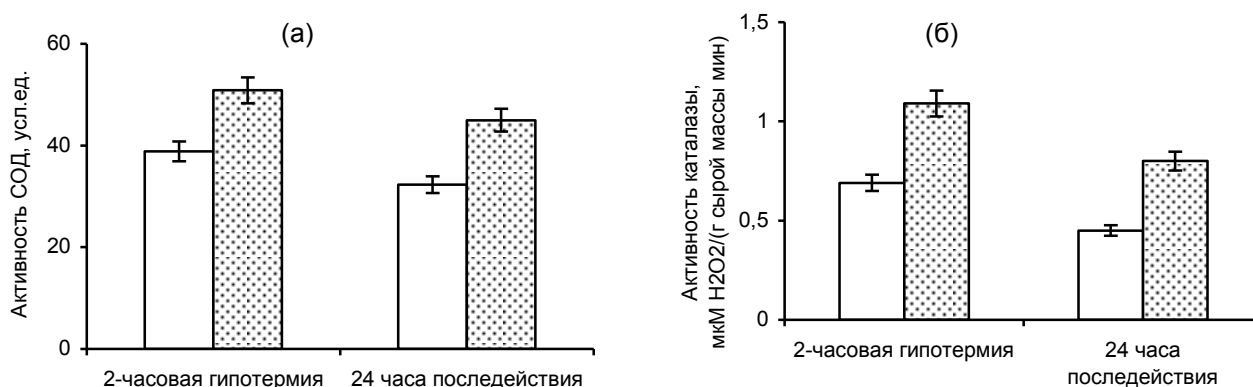


Рисунок 4 – Действие кофейной кислоты на реакции процесса ПОЛ в оптимальных условиях.

В условиях 2-часовой гипотермии ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) и в первые сутки адаптации к ней, кофейная кислота сохранила стимулирующий эффект на активность изученных антиоксидантных ферментов (рис. 5). Действие стрессора вызвало значительное накопление продуктов ПОЛ (рис. 4, 6). При этом кофейная кислота на фоне





активизации антиоксидантных ферментов заметно уменьшила реакции ПОЛ. Через сутки после действия гипотермии процесс ПОЛ существенно снизился. В этих условиях содержание гидроперекисей жирных кислот и МДА в варианте с кофейной кислотой не отличалось от контроля.



Одним из результатов работы антиоксидантной системы и процесса ПОЛ при развитии окислительного стресса является сохранение целостности мембран. В литературе отсутствуют сведения об участии гидроксикоричных кислот в проницаемости мембран для электролитов. Обработка кофейной кислотой достоверно снижала выход электролитов через мембраны (рис. 7). Более заметный



эффект отмечен в условиях действия гипотермии. Наглядно о протекторной роли кофейной кислоты в сохранении целостности мембран в условиях стресса свидетельствует рассчитанный коэффициент их повреждения.

### Влияние на фотосинтетическую деятельность

Влияние кофейной кислоты не ограничивается лишь её антиоксидантным действием, а по-видимому, носит полифункциональный характер, так как она влияет на содержание фитогормонов, регулирующих физиологические процессы и, как следствие, продуктивность. В изученной литературе не найдены данные о действии кофейной кислоты на световые реакции процесса фотосинтеза, отмечается лишь положительное влияние препарата Циркон на его интенсивность (Серегина, 2008).

Кофейная кислота не повлияла на суммарное содержание хлорофилла (рис.8), однако, как уже отмечалось, повысила количество каротиноидов (рис. 3). Для выяснения возможностей регуляторного действия кофейной кислоты на световые реакции изучали скорость транспорта электронов, сопряженного с нециклическим фотофосфорилированием по восстановлению феррицианида калия. Под влиянием кофейной кислоты его восстановление несколько интенсифицировалось (рис. 8), что может быть связано с увеличением количества ИУК. Положительная роль ауксинов в регуляции реакции Хилла является известным фактом (Buschman, Lichtenthaler, 1977; Якушкина, Похлебаев, 1980).



Рисунок 8 – Действие обработки кофейной кислотой на суммарное содержание хлорофилла и фотохимическую активность хлоропластов в оптимальных условиях и при гипотермии.

В условиях 2-часовой гипотермии ФХА хлоропластов имела достоверную тенденцию к снижению. При этом кофейная кислота сохранила величину данного показателя на уровне бесстрессовых условий (рис. 8). По-видимому, это обусловлено меньшим повреждением мембран хлоропластов в данном варианте (рис. 7), что для световых реакций фотосинтеза имеет первостепенное значение.

Интегрирующим показателем фотосинтетической деятельности является чистая продуктивность фотосинтеза. Обработка растений картофеля кофейной кислотой несколько повысила данный показатель (рис. 9), что может быть связано как с интенсификацией первичных процессов фотосинтеза (ФХА хлоропластов), так и накоплением ИУК. В литературе отмечается, что ауксины активизируют

работу РДФ-карбоксилазы – ключевого фермента цикла Кальвина (Назарова и др., 1992).

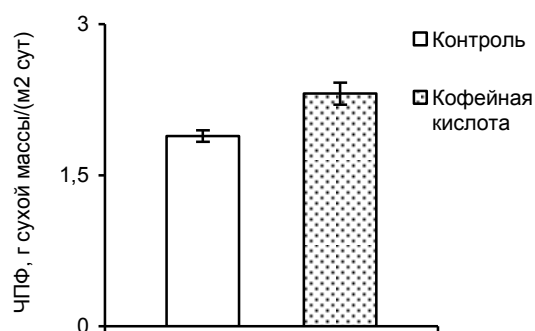


Рисунок 9 – Действие кофейной кислоты на чистую продуктивность фотосинтеза.

Для формирования хозяйственно ценных органов растения важное значение имеет не только интенсивность фотосинтетических реакций, но и донорно-акцепторные отношения, которые формируют направленный транспорт ассимилятов (Роньжина, Мокронос, 1994; Чиков, 2008). В литературе не найдено сведений о действии вторичных метаболитов на транспорт ассимилятов. Известно, что основной транспортной формой ассимилятов является сахароза (Курсанов, 1984). Предобработка кофейной кислотой уменьшила содержание сахарозы в проводящей системе листа (центральная жилка+черешок), а также в стебле соответствующего метамера не только по сравнению с контролем, но и между листом и стеблем (рис. 10). Можно полагать, что это является показателем

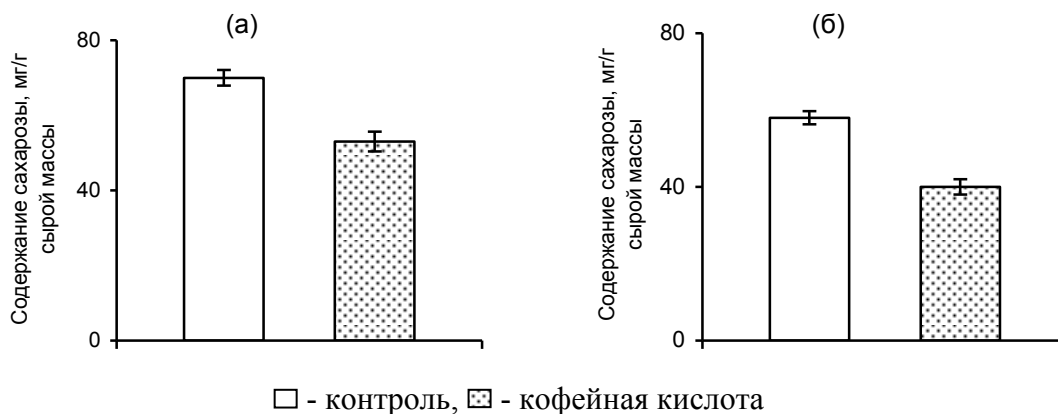


Рисунок 10 – Влияние кофейной кислоты на содержание сахарозы в проводящей системе листа и стебля побегов возобновления.

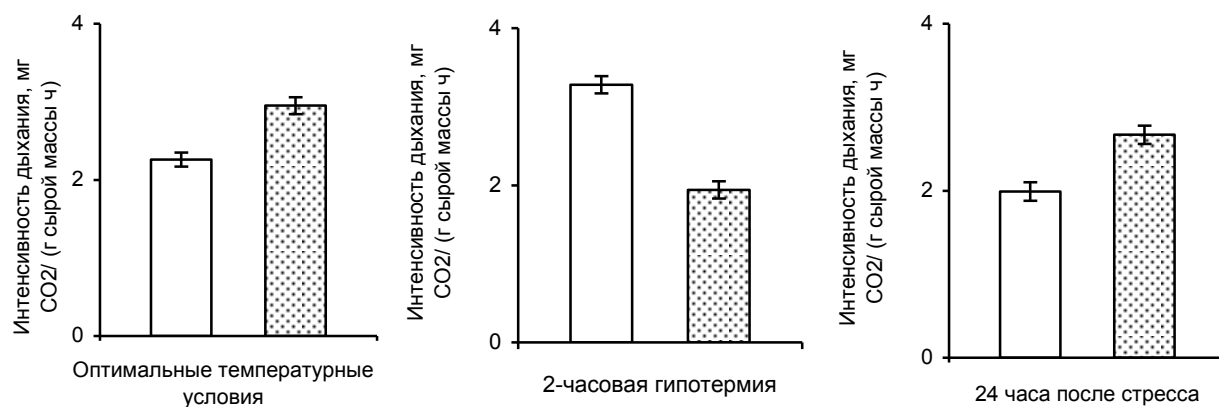
а) центральная жилка+черешок, б) стебель соответствующего метамера.

усиления оттока ассимилятов из листа в стебель. Такой результат может быть связан с большим содержанием ИУК в листьях картофеля. В ряде работ (Борзенкова, Собянина, 1995; Киселева и др., 1997) показано, что экспортной функцией ассимилятов из листа управляют ауксины.

#### Действие на процесс дыхания

В оптимальных условиях кофейная кислота несколько стимулировала интенсивность дыхания листьев 21-дневных побегов возобновления (рис. 11). В

условиях 2-часовой гипотермии ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) отмечено существенное повышение дыхания (на 45%), что является неспецифическим ответом на действие стрессора. В этих условиях кофейная кислота значительно сдерживала усиление данного процесса (на 40%). В литературе имеются сведения, что увеличение растворимых фенольных соединений в растениях озимой пшеницы в условиях действия гипотермии ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) также приводит к снижению интенсивности дыхания (Загоскина и др., 2005). Через сутки, когда в контрольном варианте наступила стабилизация дыхания, кофейная кислота вновь способствовала интенсификации процесса.



□ - контроль, ▨ - кофейная кислота

Рисунок 11 – Влияние кофейной кислоты на интенсивность дыхания при действии гипотермии.

### Действие на водный обмен

Вопрос участия вторичных метаболитов в регуляции водообмена растений остается практически не изученным. Между тем, водный режим тесно связан со всеми составляющими продукционного процесса растений. Кофейная кислота не оказала влияния на оводненность листьев, вместе с тем, повлияла на один из интегральных термодинамических показателей водного режима – водоудерживающую способность, о которой судили по водоотдаче листьев (рис. 12).



Рисунок 12 – Действие кофейной кислоты на оводненность (а) и водоудерживающую способность листьев (б) побегов возобновления.

Кофейная кислота уменьшила водоотдачу листьев, что свидетельствует об увеличении количества связанной воды. Возможно, это обусловлено увеличением осмотически связанной воды. Наши данные свидетельствуют о повышении уровня осмотически активного вещества – сахарозы в мезофилле листа под воздействием кофейной кислоты (64 мг/г сырой массы против 51.5 в контроле). Не исключено, что имеет значение и повышение содержания ауксинов в листьях. В ранних работах С. Штруггера отмечалось увеличение коллоидно-связанной воды под действием гетероауксина.

## Глава 5. Влияние кофейной кислоты на рост и продуктивность растений картофеля

Ростовые показатели определяли как на ранних этапах вегетации (21-дневные побеги возобновления – лабораторные опыты), так и более поздних (фаза бутонизации, цветения, конец вегетации – вегетационные опыты). Реакция ростовых показателей растения картофеля на действие кофейной кислоты была неоднозначной. Отмечено отсутствие влияния на ростовую активность (относительную скорость роста) высоты побегов и закладку узлов – одного из этапов морфогенеза побега как в оптимальных условиях, так и при действии гипотермии (табл. 1). Имеются сведения, что препарат Циркон в опытах *in vitro* с растениями картофеля несколько сдерживал рост побегов (приблизительно на 10%) (Булдаков, 2014). Полученные нами данные, по-видимому, связаны с тем, что кофейная кислота не изменяет уровня эндогенных гиббереллинов (рис. 1б), во многом определяющих рост растений в высоту.

Таблица 1.

Влияние кофейной кислоты на ростовую активность растений картофеля в оптимальных условиях и при действии гипотермии

Вариант	Ростовая активность, %			
	оптимальные условия*		гипотермия **	
	высота	ярусность	высота	ярусность
Контроль	4.48±0.22	8.77±0.39	3.65±0.16	7.14±0.37
Кофейная кислота	4.16±0.18	9.08±0.48	3.80±0.15	7.84±0.40

\* между 7 и 14 сутками после обработки,

\*\* через 7 суток после действия гипотермии (-2°C).

Стимулирующий эффект кофейной кислоты в действии на объем корневой системы наблюдался спустя две недели после обработки растений (рис.13). В конце бутонизации выявлено возрастание площади листьев. Отмечено повышение массы – в начале побегов, а в последующем и корневой системы в варианте с кофейной кислотой (табл.2). Полученные результаты по стимуляции роста корневой системы представляют особый практический интерес, так как известно, что растения картофеля обладают слаборазвитой корневой системой (Гупало, Гончарик, 1971).

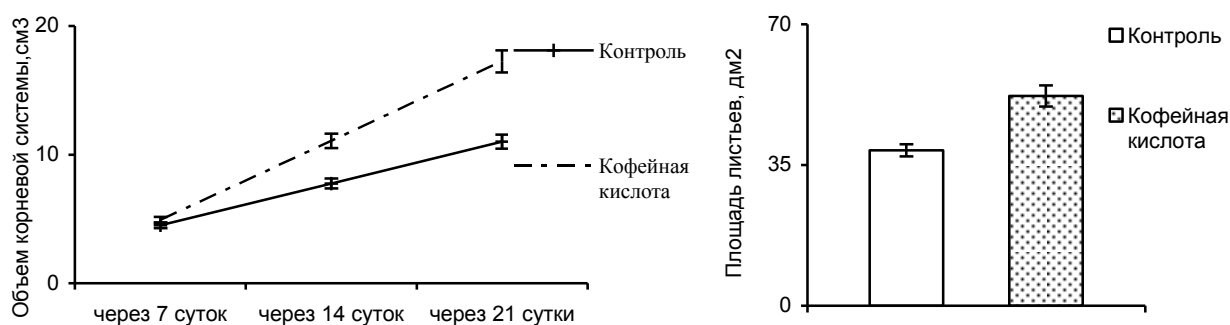


Рисунок 13 – Действие кофейной кислоты на объем корневой системы побегов возобновления (лабораторный опыт) и площадь листьев (вегетационный опыт).

Таблица 2.

Влияние кофейной кислоты на сырую массу побегов и их придаточных корней (вегетационный опыт).

Вариант	Время после обработки, сут			
	7		17	
	побеги	корни	побеги	корни
Контроль	33.6±1.6	6.6±0.3	67.9±3.4	21.5±1.0
Кофейная кислота	52.6±3.1	6.8±0.3	86.1±4.3	40.0±2.2

Кофейная кислота сохранила свой эффект в действии на массу растения и через 10 суток после действия стрессора, имитирующего заморозки (рис.14), на фоне активизации работы антиоксидантных ферментов в данных условиях (рис. 5). В литературе также имеются сведения о том, что кофейная кислота (25 мкМ) снимала отрицательное действие понижения температуры среды до +8°C на массу органов у теплолюбивого растения огурца (Wan et al., 2015).

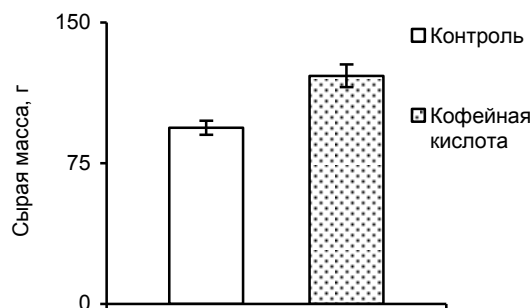


Рисунок 14 – Влияние последствия гипотермии на массу растения в зависимости от обработки кофейной кислотой.

Для растения картофеля хозяйственно-ценными органами являются формирующиеся клубни. В этой связи представляло интерес изучить действие



кофейной кислоты на процесс столоно- и клубнеобразования. Обработка растений кофейной кислотой стимулировала закладку столонов (рис. 15). Анатомические исследования столонов показали увеличение диаметра сосудов ксилемы ( $0.122 \pm 0.004$  мм против  $0.106 \pm 0.003$  в контроле) при неизменном их количестве ( $8.0 \pm 0.3$  шт/мм<sup>2</sup> против  $8.8 \pm 0.3$  в контроле) в варианте с кофейной кислотой. По мнению ряда авторов (Маркаров, Головки, 1995; Пузина и др., 2000), на столоне с лучшим развитием проводящих элементов образуется клубень, а в противном случае столон остается неклубнеобразующим.

Кофейная кислота стимулировала инициацию процесса клубнеобразования (рис. 15). Возможно, это связано с повышением уровня индолилуксусной кислоты. Известно, что наряду с цитокининами, ауксины вызывают радиальный, то есть клубнеобразующий рост в субапикальной зоне столона (Чайлахян, 1984).



Рисунок 15 – Действие кофейной кислоты на закладку столонов и инициацию клубнеобразования (вегетационный опыт).

В итоге кофейная кислота на 28 % повысила продуктивность растений картофеля в условиях вегетационного опыта (почвенная культура) за счет увеличения фракции крупных клубней (рис. 16). В литературе имеются аналогичные данные, полученные в опытах *in vivo* и *in vitro* с растениями картофеля по действию препарата Циркон (Устименко, Постников, 2009; Булдаков, 2014).



Рисунок 16 – Влияние обработки кофейной кислотой на продуктивность растений картофеля (почвенная культура).

Проведенные анатомические исследования клубней показали, что кофейная кислота оказывает воздействие на формирование феллемы (пробки), защищающей клубни от патогенов в процессе хранения (рис. 17). По-видимому,

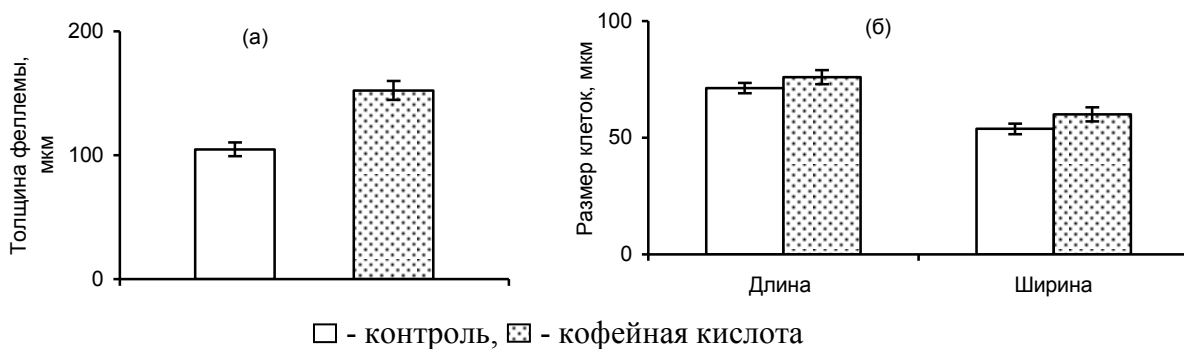


Рисунок 17 – Влияние кофейной кислоты на анатомические показатели клубня.  
а) толщина феллемы; б) размер клеток перимедуллярной зоны.

это обусловлено активизацией работы феллогена (вторичной образовательной ткани) под влиянием ауксинов. Вместе с тем, отмечено отсутствие эффекта в её действии на размеры клеток перимедуллярной зоны клубня, в которых откладывается основное количество крахмала. Последнее возможно связано с неизменным количеством гиббереллинов (рис. 1б), которые по данным (Гамбург, 1964), в темноте воздействуют на растяжение клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое комплексное исследование по действию кофейной кислоты на содержание фитогормонов, работу антиоксидантной системы, реакции ПОЛ, фотосинтетическую активность, дыхание и ростовые реакции позволило выявить участие данной гидроксикоричной кислоты в регуляции продукционного процесса растений картофеля как в оптимальных условиях, так и при гипотермии.

Выявлена специфическая реакция разных групп фитогормонов на действие кофейной кислоты: увеличение количества индолилуксусной кислоты и неизменный уровень гибберелловой кислоты. Влияние на уровень ИУК, по-видимому, обусловлено инактивацией ИУК-оксидазы кофейной кислотой (Кефели, 1997). Причины отсутствия реакции гиббереллинов на обработку растений картофеля кофейной кислотой требуют дальнейших исследований.

Антиоксидантные свойства фенольных соединений в основном показаны на примере флавоноидов (Terao et al., 1994; Запромётов, 1996; Brunetti et al., 2011; Фенольные ..., 2010, 2015). Относительно фенилпропаноидов имеются лишь единичные работы (Klein et al., 2013; Wan et al., 2015). Полученные результаты выявили активизацию как высокомолекулярной (СОД, каталаза, пероксидаза), так и низкомолекулярной (пролин, каротиноиды) антиоксидантной системы под действием кофейной кислоты. Активизация работы антиоксидантных ферментов происходила на фоне увеличения содержания ИУК, которая, как известно, вызывает экспрессию генов данных ферментов (Guan, Scandalios, 2002). Проведенный мониторинг процесса ПОЛ по начальному и конечному продуктам подтвердил антиоксидантные свойства кофейной кислоты, которая уменьшала количество МДА. После действия 2-часовой гипотермии (-2°C), имитирующей заморозки, кофейная кислота заметно снизила накопление продуктов ПОЛ и

утечку электролитов через мембраны. В первые 24 часа последствий гипотермии, несмотря на сохраняющуюся активизацию антиоксидантных ферментов в варианте с кофейной кислотой, содержание гидроперекисей и малонового диальдегида не отличалось от контрольного варианта, что может свидетельствовать об ослаблении протекторного действия кофейной кислоты на начальном этапе адаптации.

Другим аспектом работы явилось изучение участия кофейной кислоты в регуляции фотосинтетической деятельности и процесса дыхания, являющихся поставщиками как энергетических эквивалентов, так и пластических ингредиентов (Семихатова, 1995). Результаты показали отсутствие эффекта в действии кофейной кислоты на суммарное содержание хлорофилла. Несмотря на это, кофейная кислота ускоряла процесс транспорта электронов, сопряженного с нециклическим фотофосфорилированием, определенного по восстановлению феррицианида калия, на фоне повышенного уровня ауксинов, которые, как известно, регулируют реакцию Хилла через повышение содержания пластохинона и реакционных центров фотосистемы II (Buschman, Lichtenthaler, 1977), а также ускорение переноса электронов к НАДФ (Акулова и др., 1975). При гипотермии кофейная кислота сохраняла ФХА хлоропластов на уровне бесстрессовых условий на фоне снижения реакций ПОЛ и уменьшения коэффициента повреждаемости мембран. Отмечено достоверное повышение интегрирующего показателя фотосинтетической деятельности – ЧПФ под влиянием кофейной кислоты. Одновременно показано, что предобработка растений кофейной кислотой по сравнению с контролем снижала содержание сахарозы – основной транспортной формы ассимилятов, в проводящей системе листа (центральная жилка+черешок) и в стебле соответствующего метамера, а также между листом и стеблем. Это может свидетельствовать об её участии в регуляции оттока ассимилятов.

Полученные данные показали некоторую стимуляцию интенсивности дыхания под влиянием кофейной кислоты. В условиях гипотермии кофейная кислота не только сдерживала возрастание дыхания, но даже несколько снизила данный процесс.

Изучение влияния кофейной кислоты на такой важный термодинамический показатель водообмена как водоудерживающую способность клеток показало снижение водоотдачи листьев на фоне повышения содержания осмотически активного соединения сахарозы.

Выявлена неоднозначная реакция ростовых показателей растений картофеля на действие кофейной кислоты. Отмечено отсутствие влияния на ростовую активность высоты побегов и закладку узлов на фоне неизменного количества фитогормонов гиббереллинов, однако показан стимулирующий эффект в действии на массу органов, площадь листьев и объем корневой системы. Кофейная кислота в условиях гипотермии также не повлияла на высоту побегов и их ярусность, но сохранила стимулирующее действие на массу растений картофеля.

Показано положительное влияние кофейной кислоты на процесс столоно- и клубнеобразования, что, в конечном итоге, повысило продуктивность растений

картофеля. Анатомические исследования клубней показали участие кофейной кислоты в формировании феллемы (пробки), защищающей клубни от патогенов в процессе хранения. Вместе с тем, не выявлено эффекта в действии на размеры клеток перимедуллярной зоны клубня.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлено специфическое действие кофейной кислоты на *содержание фитогормонов* в растении картофеля: увеличение количества ауксинов и неизменный уровень гиббереллинов.

2. Обработка растений кофейной кислотой замедляет реакции ПОЛ, снижает выход электролитов на фоне активизации *антиоксидантной системы*. В условиях гипотермии приводит к ослаблению окислительного стресса, что выявлено по интенсивности работы антиоксидантной системы, реакциям ПОЛ и коэффициенту повреждаемости мембран.

3. *Физиологический ответ* картофеля на действие кофейной кислоты опосредован специфическими изменениями в содержании фитогормонов и работе антиоксидантной системы. Показана тенденция к повышению ФХА хлоропластов при неизменном содержании хлорофилла. Отмечено увеличение ЧПФ и интенсивности дыхания, уменьшение водоотдачи листьев. При действии гипотермии выявлено снижение возрастания дыхания и сохранение положительного эффекта на световые реакции фотосинтеза.

4. Кофейная кислота оказала неоднозначное действие на *ростовые показатели*: не повлияла на высоту побегов растений и число узлов при неизменном количестве гиббереллинов, однако увеличила массу органов, площадь листьев и объем корневой системы на фоне повышения количества ИУК и активизации фотосинтетической деятельности. В условиях гипотермии кофейная кислота сохранила стимулирующее влияние на массу растения.

5. Кофейная кислота способствовала процессу *столоно- и клубнеобразования*. В условиях вегетационного опыта повысила продуктивность растений за счет преобладания фракции крупных клубней, увеличила толщину феллемы клубней, не оказала влияния на размеры клеток их перимедуллярной зоны.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в изданиях, индексируемых в БД Agris:*

1. **Макеева, И.Ю.** Участие кофейной кислоты в регуляции физиологических процессов растений картофеля в условиях гипотермии / И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина // Вестник ОрелГАУ. – 2017. – № 1 (64). – С. 60–65.

### *Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:*

2. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на антиоксидантную активность растений *Solanum tuberosum* / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, А.Э. Анисеева, И.А. Бычков // Ученые записки Орловского государственного

университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки. – 2013. – №3 (53). – С.178–180.

3. **Макеева, И.Ю.** Ростовые реакции *Solanum tuberosum* на действие кофейной кислоты / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, О.С. Азарова // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки. – 2014. – № 3 (59). – С.126–128.

4. **Макеева, И.Ю.** Действие кофейной кислоты на уровень перекисного окисления липидов мембран в условиях гипотермии у *Solanum tuberosum* / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, И.А. Бычков, А.Г. Ануфриев // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки. – 2014. – №6 (62). – С.80–82.

5. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на дыхание и активность супероксиддисмутазы *Solanum tuberosum* при действии гипотермии / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, М.В. Чванова, И.А. Бычков // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки. – 2015. – № 4 (67). – С. 195–197.

6. **Макеева, И.Ю.** Участие кофейной кислоты в регуляции продукционного процесса картофеля *Solanum tuberosum* / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева // Агрехимия. – 2015. – № 6. – С. 63–68.

#### **Публикации в других изданиях:**

7. **Макеева, И.Ю.** Влияние салициловой и гидроксикоричных кислот на ростовые реакции *Solanum tuberosum* / Т.И. Пузина, В.Л. Ланцев, И.Ю. Макеева, С.С. Помазенкова // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII международного симпозиума. – М.: ИФР РАН, РУДН, 2012. – С. 430–434.

8. **Макеева, И.Ю.** Участие кофейной кислоты в регуляции столоно- и клубнеобразования у *Solanum tuberosum* в условиях деструктурированного тубулинового цитоскелета / И.Ю. Макеева, И.А. Бычков, А.Г. Ануфриев // Ломоносов – 2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология». – М.: Изд. Московского университета, 2014. – С. 313–314.

9. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на ростовые показатели побегов возобновления *Solanum tuberosum* / И.Ю. Макеева, А.Э. Аникеева // Сборник статей Международной научной конференции «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий». – Калининград: Аксиос, 2014. – Ч. I. – С. 279–282.

10. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на окислительные процессы и рост побегов возобновления *Solanum tuberosum* / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, А.Г. Ануфриев, И.А. Бычков // Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 135-летию со дня рождения профессора В.Н.Хитрово «Актуальность идей В.Н.Хитрово в исследовании биоразнообразия России» и Круглого стола «Продукционный процесс растений и его регуляция» в честь 110-летия со дня рождения профессора С.И.Ефремова. – Орел: издательский дом «Орлик», 2014. – С.167–170.

11. **Макеева, И.Ю.** Специфика действия кофейной кислоты на фотосинтетическую активность и ростовые реакции *Solanum tuberosum* / И.Ю. Макеева, И.А. Бычков // Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. М.:МАКС Пресс, 2015. – С. 343–344.

12. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на содержание фитогормонов и ростовые реакции *Solanum tuberosum* в зависимости от состояния тубулинового цитоскелета / И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина // Сборник материалов IX Международного Симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: ИФР РАН, 2015. – С. 356–361.

13. **Макеева, И.Ю.** Влияние кофейной кислоты на ростовые показатели *Solanum tuberosum* в условиях деструкции микротрубочек / И.Ю. Макеева, Т.И. Пузина, Н.С. Власова // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. – С. 325.

14. **Макеева, И.Ю.** Фотохимическая активность хлоропластов и ростовые реакции *Solanum tuberosum* в условиях гипотермии при действии кофейной кислоты / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы VIII Международной научной конференции. – Минск: Институт экспериментальной ботаники, 2015. – С. 97.

15. **Макеева, И.Ю.** Участие кофейной кислоты и селена в регуляции работы антиоксидантной системы *Solanum tuberosum* в условиях деструктурированного тубулинового цитоскелета / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, Н.С. Власова // Фундаментальные и прикладные проблемы современной биологии растений: сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН. – Москва, ИФР РАН, 2015. – С. 538-542.

16. **Макеева, И.Ю.** Действие кофейной кислоты на показатели водообмена у *Solanum tuberosum* / И.Ю. Макеева // Повышение эффективности сельскохозяйственной науки в современных условиях: Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. – Орел: ФГБНУ ВНИИЗБК, 2015. – С. 92–95.

17. **Макеева, И.Ю.** Физиолого-биохимические ответы *Solanum tuberosum* на действие кофейной кислоты / И.Ю. Макеева, А.С. Сдержикова, И.А. Бычков, Д.А. Селиверстов, Т.И. Пузина. // Материалы конференции с международным участием "Актуальные проблемы естественнонаучного образования, защиты окружающей среды и здоровья человека. – Орел, 2016. – С. 227–232.

18. **Макеева, И.Ю.** Влияние селенит-йона и кофейной кислоты на формирование феллемы клубней *Solanum tuberosum* в условиях целостного и деструктурированного тубулинового цитоскелета / Т.И. Пузина, Н.С. Власова, И.Ю. Макеева // Всероссийская научная конференция с международным участием «Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений». – Саранск, 2016 г. – С. 221–224.

19. **Макеева, И.Ю.** Специфика действия селена и кофейной кислоты на гормональный статус *Solanum tuberosum* в зависимости от структурного состояния микротрубочек / Т.И. Пузина, И.Ю. Макеева, Н.С. Власова // Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма». – СПб., 2016 г. – С. 206–207.

20. **Makeeva, I.Yu.** The hormonal status and the growth reactions of *Solanum tuberosum* in the destruction of actin and tubulin cytoskeleton / T.I. Puzina, N.S. Vlasova, I.Yu. Makeeva, V.L. Lantsev // 3rd International Conference «Plant Nutrition, Growth & Environment Interactions». – Vienna, Austria, 2017. – P. 41.

### Список используемых сокращений

Г<sub>А</sub><sub>3</sub> – гибберелловая кислота  
ИУК – индолилуксусная кислота  
МДА – малоновый диальдегид  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СОД – супероксиддисмутаза  
ФХА – фотохимическая активность  
ЧПФ – чистая продуктивность фотосинтеза