

**ИЗМЕНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ТЕСТ-РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
TRITICUM AESTIVUM L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ N⁶-РАМНОЗИЛАДЕНИНА****Черепанов Игорь Сергеевич**ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»,
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, д. 1Канд. хим. наук, доцент, доцент кафедры Фундаментальной и прикладной химии;
e-mail: cherchem@mail.ru

*Новый синтетический N-гликозиламин – N⁶-рамнозиладенин изучен в качестве потенциального биологически активного вещества в отношении процессов прорастания семян пшеницы (*Triticum aestivum L.*). Результаты вегетационных экспериментов демонстрируют ингибирование роста корней тестируемых растений при увеличении концентрации рамнозиладенина. Характер и динамику изменения первичных метаболитов тест-растений исследовали методом колебательной спектроскопии посредством изучения инфракрасных спектров проростков. Анализ профилей спектральных полос позволяет обнаружить метаболические изменения, вызванные влиянием рострегулятора. Изменения положения и интенсивности комбинации низкочастотных спектральных полос, относимых к колебаниям сахаридных фрагментов, по мере увеличения концентрации рамнозиладенина указывают на снижение углеводного пула, иллюстрируя ингибирование синтеза полисахаридов. Аналогичное изменение концентрации рамнозиладенина приводит к снижению содержания белков, предположительно, вследствие повышения активности протеаз, интенсифицирующих гидролитическое расщепление протеинов растений до свободных аминокислот. Анализ высокочастотной области спектров показывает переход молекул липидов в скошенные конформации при увеличении содержания препарата, что может быть связано с ростом разупорядоченности мембран. Полученные результаты исследования планируется использовать при дальнейшей разработке методик направленной модификации производных аденина.*

Ключевые слова: аденин, органические вещества, пшеница, *Triticum aestivum L.*, ИК-Фурье спектроскопия, метаболиты.

Одним из наиболее важных классов органических веществ, обладающих биологической активностью, являются производные 6-аминопурина (аденина), замещенные на атомах азота аминогруппы различными фрагментами: 2-изопентенилом, бензилом, *o, n*-азидобензилом [1]. Проявление биологической активности последних было доказано при низких (10^{-6} ммоль) концентрациях, что говорит о перспективности их использования в сверхмалых дозах и соответствующей экономии [2]. Гликозилированные аденины обладают достаточной растворимостью в воде и относительной стабильностью в растворах по сравнению с классическими препаратами, такими как кинетин, 6-бензиламинопурин [3]. Проблемы синтеза этих производных и природа их биологической активности в научной литературе освещены в незначительной степени: следует отметить, что большинство исследований посвящено изучению проблем синтеза, структуры и биологической активности продуктов конденсации аденина с *D*-рибозой и *D*-глюкозой [4, 5], в то время как другие углеводы не менее интересны с точки зрения образования биологически активных производных, про-

являющих свойства регуляторов роста растений. *L*-рамноза, как было показано ранее [6], устойчива в условиях реакций гликозилирования и позволяет получать с высокими выходами стабильные *N*-гликозиды, что особенно важно в реакциях с достаточно инертным аденином.

Изменение физиологии растений определяется на основе отклонения от любых различий в конформации, структуре и содержании биомолекул [7]. В растении *N*⁶-замещенные аденины участвуют во многих метаболических процессах и процессах развития [5], обнаруживая цитокининовую активность. Существует необходимость в исследовании новых биологически активных замещенных аденинов, включая их производные, модифицированные различными гетерофункциональными фрагментами, такими как углеводные фрагменты.

Моделирование в части сопоставления структуры гликозиладенинов с биоактивностью показывает [6, 7], что рострегулирующие свойства и способность к активации фотосинтетического аппарата тест-растений может быть связана с увеличением способности молекул синтезированного продукта к гидрофильным

взаимодействиям за счет введения углеводного фрагмента.

Кроме того, ранее нами были установлены некоторые закономерности в изменении спектральных характеристик проростков тест-растения с концентрацией гликозилированного маннозой аденина в растворах проращивания [8]. В частности, в спектральном ИК-области 1500–1200 см⁻¹ фиксируются различия в профилях спектральных полос с изменением концентрации маннозиладенина в растворах проращивания, также с ростом концентрации снижается интенсивность полос в области 1250–1220 см⁻¹ (ν_{CN} , δ_{OH} , ν_{CO} , ν_{PO_2}) и сигнала 1460 см⁻¹ (концевые группы лигнинов, белков, δ_{CH} липидов). В противоположность этому интенсивность полосы при 1395 см⁻¹ (высшие жирные кислоты, пектины, $\nu_{\text{COO}^-} + \delta_{\text{CH}}$) изменяется с ростом концентрации в обратном направлении. Описанные корреляции указывают на возможность оценки динамики накопления (деструкции) продуктов биосинтеза в ходе роста и развития растений посредством анализа колебательных спектров. В связи с этим, представляются актуальными систематические исследования изменения состояния полисахаридов, липидов и протеинов тест-растений под влиянием N⁶-гликозилированного аденина. Таким образом, целью настоящей работы являлось изучение действия аминоконъюгата аденина с L-рамнозой на характер изменения первичных метаболитов в процессе проращивания семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Методика

Синтез N⁶-рамнозиладенина: 0,02 г аденина и 0,02 г L-рамнозы растворяли в 5 мл дистиллированной воды и полученный раствор в фарфоровой чашке медленно выпаривали досуха, твердый продукт последовательно промывали холодной водой, этанолом и сушили в эксикаторе [6]. Для идентификации синтезированного продукта (выход 83%) использовали данные элементного анализа и ИК-спектроскопии:

– элементный состав: С, % – 47,22; Н, % – 5,41; N, % – 25,32%.

– ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 1649, 1604 ($\nu_{\text{C=N}}$, $\nu_{\text{C=C}}$); 1580 (δ_{NH}); 1510 ($\delta_{\text{C-N9-H}}$); 1309 ($\nu_{\text{C-N}}$); 1122, 1060 ($\delta_{\text{C-O-C}}$, $\nu_{\text{C-O-H}}$, $\nu_{\text{C-O}}$); 1015 (N-гликозид).

Проращивание семян тестируемого растения (пшеница мягкая *Triticum aestivum* L., сорт Московская-39) проводили в трех параллелях в чашках Петри при температуре 22°C, для чего 10 семян раскладывали на полностью увлажнен-

ную фильтровальную бумагу и помещали в термостат для проращивания. Эксперименты проводили в течение 4 дней [9], по окончании которых длину корней (l, см) нормально пророщенных семян контролировали в 0,1%, 0,01% и 0,001% растворах N⁶-гликозилированного аденина по сравнению с контролем (дистиллированная вода), статистическая обработка результатов состояла в расчете средних значений и их доверительных интервалов при уровне вероятности 95%.

Для изучения характера действия синтезированного продукта на ростовые процессы образцы (2 мг) биотестированных корней высушивали в термостате при температуре 500 °C в течение 10 ч, измельчали в планетарной мельнице до однородной массы, таблетировали с предварительно прокаленным (600 °C, 4 ч) KBr (1:300) («Fluka») и регистрировали колебательные спектры на ИК-Фурье-спектрометре ФСМ-2201 (ООО «Инфраспек», СПб, Российская Федерация) в диапазоне волновых чисел 4000–400 см⁻¹ с разрешением по волновому числу 2 см⁻¹ (60 циклов накопления относительно воздуха), полученные спектры обрабатывали в программе FSpec 4.0.3.9, отнесение полос проводили на основании данных, полученных в работах [6, 7, 10]. Сравнительную оценку интенсивности полос поглощения в амидной области (1800–1500 см⁻¹) выполняли по методу базовой линии, определяя высоту пика (A_h) в относительных единицах поглощения («peak-height»-подход), а также интегрированием площади под пиком (A_s) («peak-area»-подход).

Результаты и обсуждение

Данные о длине корней проростков опытных растений в присутствии N⁶-рамнозиладенина в различных концентрациях приведены в табл. 1.

Анализ полученных данных иллюстрирует ингибирование прорастания семян в растворах исследуемого препарата, уменьшающееся с уменьшением его концентрации. Полученные результаты хорошо согласуются с данными других исследователей, также отмечавшими ингибирование роста корней под действием экзогенных цитокининов за счет уменьшения числа делящихся клеток [11].

Как указывалось выше, путем изучения колебательных спектров образцов растений удастся обнаружить изменения первичных метаболитов, связанные с биохимическими процессами [7], и объяснить результаты вегетационных экспериментов. Спектральная идентификация основ-

1. Влияние N⁶-рамнозиладенина на длину корней проростков пшеницы мягкой

Среда	Контроль	0,1%	0,01%	0,001%
l, см	3,85 ± 0,08	0,19 ± 0,02	2,88 ± 0,05	3,06 ± 0,06

Примечание. Значениями ±Δ указан доверительный интервал (P = 95%)

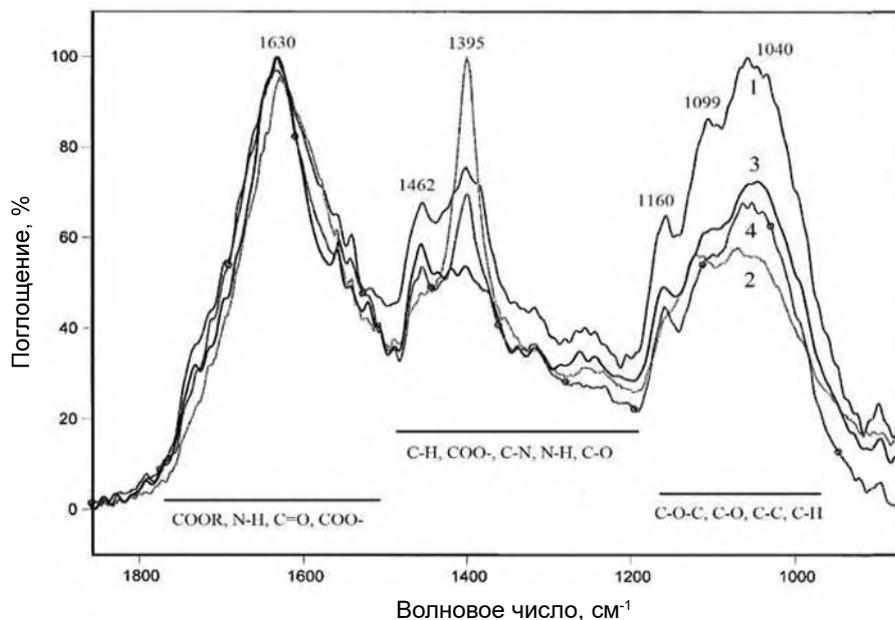


Рис. 1. Спектральная идентификация первичных метаболитов в контрольных (1) и исследуемых образцах в области 1800–1000 см⁻¹ при различных концентрациях N⁶-рамнозиладенина в растворах для проращивания: 2 – 0,1%; 3 – 0,01%; 4 – 0,001%.

ных первичных метаболитов в контрольном и пророщенных при различных концентрациях N⁶-рамнозиладенина образцах представлена на рис. 1, 2.

Углеводы. В области 1200–1000 см⁻¹, характеризующейся достаточным спектральным разрешением, отчетливо проявляются полосы колебаний, относимые к углеводным фрагментам [10]. Полоса 1040 см⁻¹ (ксиланоглюканы, $\nu_{CC,CO}$) четко проявляется в спектре контрольного образца, и в существенно меньшей степени для образцов, пророщенных в 0,01 и 0,001% растворах. Для образца, пророщенного в 0,1% растворе, указанный сигнал проявляется только в виде плеча и слабой полосы с максимумом 1068 см⁻¹ (гемилцеллюлозы, $\nu_{CC,CO} + \delta_{OCH}$). Полоса 1099 см⁻¹ (целлюлоза, δ_{COC}) регистрируется в виде четкого пика в спектре контроля и в виде пологих максимумов в спектрах образцов 3 и 4, сигнал (1→4)-гликозидных связей целлюлоз при 1160 см⁻¹ (ν_{asCOC}) в спектрах 1, 3, 4 также проявляется отчетливо. В спектре образца 2 фиксируется только размытая малоинтенсивная полоса в области 1125–1100 см⁻¹, при этом сигнал целлюлоз 1160 см⁻¹ проявляется исключительно

в форме слабого плеча. Последнее может быть свидетельством ингибирования синтеза целлюлоз при более высоких (до 0,1%) концентрациях N⁶-рамнозиладенина [10], что согласуется с результатами вегетационных экспериментов.

Протеины. «Протеиновая» область 1800–1500 см⁻¹ (рис. 1) представлена для всех образцов широкой полосой с максимумом при 1630 см⁻¹ (Амид I, $\nu_{CO,NH,CN}$), для которой в отличие от углеводной области характерны достаточно близкий профиль в спектрах всех образцов, что для изучения влияния рострегулятора предполагает оценку значений интенсивности полос.

Сравнительная оценка интенсивности указанных полос показывает ее постепенное уменьшение в ряду спектров образцов 4→3→2, пророщенных в растворах рамнозиладенина (табл. 2).

Динамика изменения количества протеинов с применением двух подходов несколько отличается, что, вероятно, связано с проявлением ряда оптических эффектов [12]. Контрольный образец (спектр 1) в обоих случаях характеризуется выпадающим из данного ряда значением, что, возможно, связано с отсутствием в системе рамнозиладе-

2. Интенсивности амидных полос в спектральной области 1800–1500 см⁻¹ корней контрольных и обработанных N⁶-рамнозиладенином проростков пшеницы мягкой

Система	Контроль	0,1%	0,01%	0,001%
A_h	0,35 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,35 ± 0,08	0,37 ± 0,05
A_s	4,10 ± 0,08	3,94 ± 0,07	4,42 ± 0,10	4,43 ± 0,07

Примечание: значениями ± Δ указан доверительный интервал (P = 95%)

нина, и, как следствие, его метаболитов. Наличие последних в образцах 2–4 может изменять полярность протеиновых молекул в целом посредством формирования межмолекулярных связей при образовании их комплексов с белками, что приводит к изменению интенсивности амидных полос [13]. Образец 2 дополнительно характеризуется слабым плечом 1601 см^{-1} , характерным для аминокислот боковых цепей ($\nu^{\text{as}}_{\text{COO}^-}$). Можно предположить, что повышение концентрации N⁶-рамнозиламина приводит к снижению содержания протеинов благодаря увеличению активности протеаз, интенсифицирующих гидролитическое расщепление до свободных аминокислот [14].

Липиды. Область $3000\text{--}2850\text{ см}^{-1}$ (рис. 2) включает три основных полосы (липиды с некоторым вкладом протеинов, углеводов и нуклеиновых кислот): 2855 см^{-1} ($\nu^{\text{s}}_{\text{CH}_2}$), 2922 см^{-1} ($\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_2}$) и 2954 см^{-1} ($\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_3}$). Сигнал в области 2920 см^{-1} ассоциируется со степенью мембранной упорядоченности [15]: смещение максимума данной полосы может быть индикатором перехода липидных молекул в скошенные конформации. Для контрольного образца полоса $\nu^{\text{as}}_{\text{CH}_2}$ имеет максимум при 2920 см^{-1} , тогда как для всех образцов, пророщенных в растворах рамнозиладенина, максимум полосы смещается к значениям 2922 см^{-1} , что указывает на увеличивающийся вклад скошенной конформации углеводородной цепи и, как следствие, рост разупорядоченности липидных мембран. Ширина полосы 2922 см^{-1} для образца 2 имеет также максимальную ширину в сравнении с другими образцами, указывая на повышенную

пластичность мембран [15], что ведет к активации мембранно-связанных энзимов.

Заключение

Методом колебательной спектроскопии изучено влияние синтезированного на основе аденина углеводного аминоконъюгата на характер изменения первичных метаболитов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (углеводы, белки, липиды). Полученные данные позволяют сделать вывод, что N⁶-гликозилированный L-рамнозой аденин действует как ингибитор роста тест-растений, особенно в высокой концентрации. Анализ профилей спектров указывает на ингибирование синтеза углеводов в растениях, усиление гидролитического расщепления белков и нарушение липидных мембран с увеличением концентрации рамнозиламина. Результаты настоящего исследования перспективны для разработки методов функционализации аденина с целью получения регуляторов роста направленного действия.

Литература:

1. Mornet R., Theiler J., Leonard L. Active cytokinins. Photoaffinity labeling agents to direct binding // *Plant Physiol.* – 1979. – V. 64. – P. 600–610.
2. Mhatre V., Joshi V. Synthesis of new substituted 6-ureidopurines and 6-ureido-9-(2,3,5-triacetylribofuranosyl)purine having cytokinin (plant growth promoting) activity // *Indian J. Chem.* – 2002. – V. 41B. – P. 2667–2675.
3. Fleysher M. N⁶-substituted adenosines: synthesis, biological activity, and some structure-activity relationships // *J. Med. Chem.* – 1972. – V. 15. – P. 187–191.

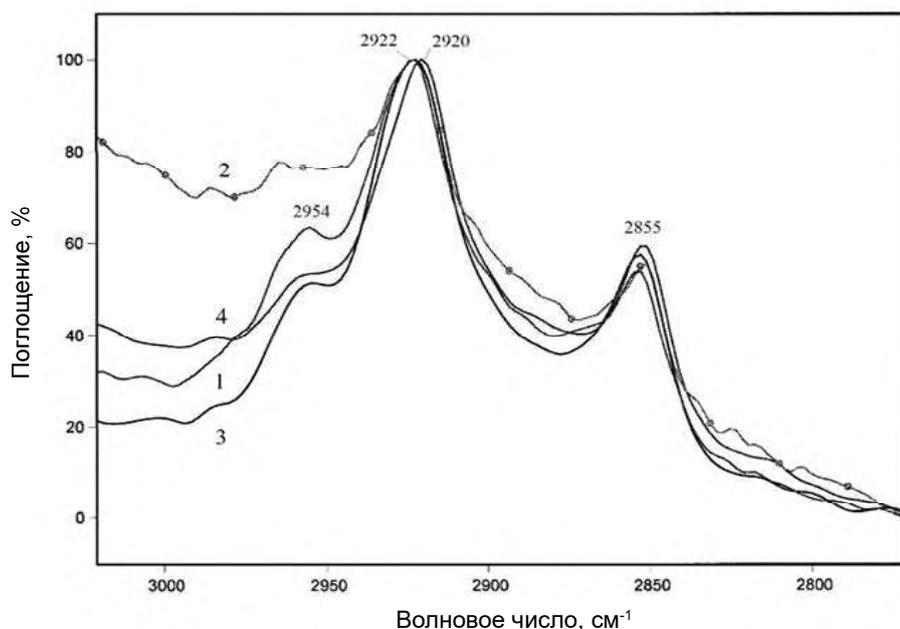


Рис. 2. Спектральная идентификация первичных метаболитов в контрольных (1) и исследуемых образцах в области $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ при различных концентрациях N⁶-рамнозиладенина в растворах для прорастивания: 2 – 0,1%; 3 – 0,01%; 4 – 0,001%.

4. *Nashalian O., Yaylayan V.* Reactivity of nitrogen atoms in adenine and (Ade)₂Cu complexes towards ribose and 2-furanmethanol: formation of adenosine and kinetin // *Food Chem.* – 2017. – V. 215. – P. 463–469.
5. *Hou B., Lim E.-K., Higgins G., Bowles D.* N-Glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 47822–47832.
6. *Черепанов И.С., Камашева А.А., Каушанова Э.И.* Синтез и биологическая активность N⁶-маннопиранозиладенинов // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* – 2021. – № 2. – С. 310–317.
7. *Acemi A., Turker-Kaya S., Ozen F.* FT-IR spectroscopy-based evaluation of changes in primary metabolites of *Amsonia orientalis* after in vitro ⁶-benzylaminopurine treatment // *Not Bot Horti Agrobio.* – 2016. – V. 44. – P. 206–214.
8. *Черепанов И.С., Каушанова Э.И., Феофилова Д.С., Нуреева Р.Н.* Динамика образования первичных метаболитов в растениях *Triticum aestivum* L. под влиянием N⁶-маннозиладенина // XII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Химия и технология растительных веществ»: сб. тез.: Киров, 29 нояб. – 2 дек. 2022 г. – Киров, 2022. – С. 235.
9. *Неверов А.А., Верещагина А.С.* Влияние микроэлементов на формирование проростков ячменя в условиях оптимального и недостаточного увлажнения // *Известия НВ АУК.* – 2022. – № 3. – С. 180–188.
10. *Sharma S., Uttam K.* Early diagnostics of mercury stress of wheat seedlings using attenuated total reflection Fourier transformed infrared spectroscopy // *Analyt. Lett.* – 2018. – V. 51. – P. 1544–1563.
11. *Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J.* The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *Plant Cell.* – 2015. – V. 27. – P. 44–63.
12. *Бородин А.В., Климов А.А., Никодимов С.И., Шахмаев А.А., Прибора В.Н.* Ингибиторы окисления в изоляционных маслах. Определение методом инфракрасной Фурье-спектрометрии // *Лаборатория и производство.* – 2019. – № 4. – С. 102–110.
13. *Зюбин А.Ю.* Спектрально-кинетиические исследования фотофизических процессов с участием молекул красителей и биомолекул в присутствии наночастиц серебра / Дисс ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.05. Калининград, 2018. – 160 с.
14. *Rico C.M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L.* Differential effect of Cerium oxide nanoparticles on rice, wheat, and barley roots: a Fourier Transform infrared (FT-IR) microspectroscopy study // *Applied Spectroscopy.* – 2015. – V. 69. – P. 287–295.
15. *Sharma S., Uttam K.* Investigation of manganese stress on wheat plant by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy // *Spectrosc. Lett.* – 2016. – V. 49. – P. 520–526.

Cherepanov I.S.

CHANGES IN *TRITICUM AESTIVUM* L. PRIMARY METABOLITES UNDER CONDITION OF N⁶-RHAMNOSYLADENINE TREATMENT

*New synthetic N-glycosylamine – N⁶-rhamnosyladenine studied as potential biological active substance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds germination. Germination experiments results demonstrate test-plant growth inhibition with increase the rhamnosyladenine concentration. Primary metabolites changes investigated using vibrational spectroscopy by the registering of germinated seedlings infrared Fourier transform spectra. Analysis of band profiles allows to detect some differences, caused by the rhamnosyladenine influence. Changes of low-frequencies spectral bands position and intensity, assigned to sugar fragments ordinary bond vibration, show the reducing of carbohydrate content with the rhamnosyladenine concentration increase, illustrating carbohydrate (cellulose) synthesis inhibition. The similar variation of rhamnosyladenine concentration leads to decreasing of protein content presumably due to increase in the activity of proteases that intensify hydrolytic cleavage to free amino acids. In lipid membranes molecules undergo trans-to-gauche transition under condition of increasing of rhamnosyladenine content, which indicate the lipid membrane disorder. Results of the study presented may be useful for development of synthetic method for adenine derivatives modification.*

Keywords: adenine, wheat, organic substances, *Triticum aestivum* L., IR Fourier transform spectroscopy, metabolites.