

УДК 581.1:633.358

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНОКУЛЯЦИИ *RHIZOBIUM* НА СОСТАВ СВОБОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© Л.Е. Макарова\*, Л.В. Дударева, Н.А. Соколова, Т.Е. Путилина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,  
ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 (Россия), e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

С целью изучения реакции растений гороха (*Pisum sativum* L.) на инокуляцию бактериями *Rhizobium* в экстрактах из корней этиолированных проростков, полученных в два этапа (при помощи 80% этанола и этилацетата), изучали состав свободных фенолкарбоновых кислот (ФКК). Результаты исследования компонентов экстрактов различными методами (бумажная хроматография, ТСХ, капиллярный электрофорез, УФ- и ГХ-МС-спектроскопия и др.) позволили отнести к числу свободных ФКК *n*-кумаровую, *o*-кумаровую, феруловую, бензойную, *n*-оксибензойную, ванилиновую, галловую, гентизиновую, салициловую кислоты. К ним пока не причислена *c*-резорциловая кислота, впервые обнаруженная в исследуемых экстрактах методом ГХ-МС. Мониторинг состава ФКК в 5-миллиметровых отрезках корней, проведенный методом ГХ-МС-анализа, выявил влияние инокуляции только на локализацию гентизиновой кислоты. Обсуждается возможность совместного участия салициловой и гентизиновой кислот в индукции ответных реакций корневых клеток на инокуляцию корней бактериями *Rhizobium*.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, корень, проросток, фенолкарбоновые кислоты.

### Введение

В тканях растений доля фенолкарбоновых кислот (ФКК) относительно других ароматических компонентов обычно низка. Это объясняется прежде всего тем, что они являются предшественниками более сложных ароматических веществ [1, 2]. У различных таксономических групп растений составы ФКК и их ароматических дериватов имеют характерные особенности. М.Н. Запрометов [1], характеризуя распространенность ФКК в растениях, бензойную, *n*-оксибензойную, ванилиновую, *n*-кумаровую, феруловую кислоты привел в перечне общераспространенных. Галловая и гентизиновая кислоты были отнесены к числу часто встречающихся, а салициловая, сиреневая и *o*-пирокатеховая кислоты – к числу реже встречающихся. Для растений семейства бобовых свойственны *o*-кумаровая и мелилотовая кислоты [1, 3]. Наряду с ними в свободном и связанном виде найдена салициловая кислота [4], а в составе сложноэфирных соединений недавно обнаружена 1,2-дикарбокси-бензойная (*o*-фталева) кислота [5].

Часть ФКК входит в состав сложноэфирных соединений (с сахарами и др.), а часть обнаруживается в свободной форме [6]. Физиологическое значение ФКК для растений не ограничивается их расходом для биосинтеза более сложных ароматических компонентов. Вероятно, только свободные ФКК благодаря наличию у них не занятых эфирными связями реактивных группировок (арильные гидроксилы, карбоксильные группировки) являются активными участниками физиолого-биохимических процессов в клетках [1, 7].

---

Макарова Людмила Евгеньевна – заведующая лабораторией, доктор биологических наук, e-mail: makarova@sifibr.irk.ru  
Дударева Любовь Виссарионовна – заведующая лабораторией, кандидат биологических наук, e-mail: lazer@sifibr.irk.ru  
Соколова Наталья Александровна – ведущий технолог  
Путилина Татьяна Егоровна – ведущий технолог

Так, еще в 70-х гг. прошлого столетия была отмечена прямая связь между возрастанием концентрации ФКК в тканях растения вследствие высвобождения их из гликозидов и повышением устойчивости растения к фитопатогенам [8]. Позднее особую роль в устойчивости растений к заболеваниям и действию

\* Автор, с которым следует вести переписку.

неблагоприятных абиотических факторов, а также в проявлениях гиперчувствительных реакций клеток при их инфицировании фитопатогенами определили свободной салициловой кислотой [9–11]. Авторы работы [11] отмечают и важную роль гентизиновой кислоты в сигналинге при индуцировании защитных реакций с участием салициловой кислоты. Роль гентизиновой кислоты они связывают с активацией синтеза определенной группы PR-белков, на который салициловая кислота, по-видимому, не влияет.

Возрастание уровня активных форм кислорода (АФК), являющееся показателем проявления защитных реакций, возможно при участии ФКК в качестве прооксидантов. Например, повышению концентрации  $H_2O_2$  путем ингибирования активности каталазы может способствовать салициловая кислота [9]. Совместно с пероксидазами и в присутствии  $H_2O_2$  феруловая и салициловая кислоты могут генерировать токсичный для клеток  $O_2^-$  [12, 13]. Однако в литературе достаточно фактов, указывающих на проявления фенольными кислотами и антиоксидантной активности. Для ряда ФКК неоднократно доказана высокая антирадикальная активность в липидосодержащих системах [14]. Возможно, в результате действия одного из механизмов скавенгирования АФК у некоторых ФКК без участия ферментов происходит гидроксилирование бензольного кольца [15].

Особое значение в защитных реакциях имеют фенольные кислоты  $C_6-C_3$ -ряда, как соединения, необходимые для образования лигнина и лигниноподобных компонентов [1, 2], способствующих укреплению клеточных стенок, служащих физическим барьером для проникновения микроорганизмов.

О роли ФКК в бобово-ризобиальном симбиозе известно мало. В этом плане в литературе имеются более конкретные данные лишь для салициловой кислоты, наиболее популярной у исследователей, занимающихся изучением ответных реакций у растений при их взаимодействиях с микроорганизмами. На участие этой кислоты в регуляции инфицирования ризобиями и нодуляции указывают факты, приведенные в работах [16, 17], где установлены влияние ризобиальных Nod-факторов на содержание свободной салициловой кислоты в корнях бобовых растений и зависимость устойчивости к *Rhizobium* и эндомикоризальным грибам *Glomus mosseae* от ее уровня в клетках.

Исследования состава свободных ФКК в корнях бобовых растений, подвергающихся инокуляции *Rhizobium*, и локализации их в зонах различной чувствительности к этим бактериям позволят иметь информацию для обоснования необходимости последующих исследований роли этих соединений в бобово-ризобиальном симбиозе. В связи с этим основной целью в представляемой работе было изучение состава свободных ФКК и выявление особенностей локализации этих соединений в корнях инокулированных и неинокулированных *Rhizobium* проростков гороха (*Pisum sativum* L. семейства Fabaceae).

### Экспериментальная часть

**Выращивание растений.** В работе использовали этиолированные проростки гороха сорта Марат, выращенные в кюветках на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 22 °С, без освещения. Исходным растительным материалом служили двухсуточные проростки, у которых средняя длина корня составляла  $3,0 \pm 0,2$  см. Часть полученных таким образом проростков подвергали инокуляции *Rhizobium*, часть продолжала расти в тех же условиях, что и исходные проростки, и служила контролем. Через 24 ч от начала эксперимента (от начала инокуляции) для исследований брали корни, длина которых достигала 45–50 мм. Корни фиксировали 96% кипящим этанолом. При этом часть корней фиксировали целиком, часть нарезали на сегменты длиной 0,5 см.

**Инфицирование *Rhizobium*.** Инокуляцию проводили бактериями *R. leguminosarum* bv. *viceae* штамма 250a – СИАМ 1026 (получен из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин). Инокулят, содержащий бактерии *R. leguminosarum* (титр  $2 \times 10^7$  клеток/мл среды), вносили в начале эксперимента в виде небольшого объема (1 мл/растение) жидкости – смыва культуры бактерий, выращенной на твердом агаровом субстрате по методу [18].

**Экстракция ФКК.** Из растительного материала «растворимые» фенольные соединения (ФС) экстрагировали 80% этанолом на водяной бане. После удаления этанола из спиртового экстракта при помощи вакуумного испарителя водный остаток подкисляли 2 н HCl до pH 3–4 и из него ФС извлекали этилацетатом (3–4-кратно, при соотношении объемов 1 : 1). После упаривания этилацетата в токе холодного воздуха и в темноте получали остаток, который растворяли в небольшом объеме 96% этанола. ФКК из полученного таким путем экстракта отделяли от других ФС при последующем разделении на бумажной хроматограмме в 5% уксусной кислоте. С хроматограммы соединения, вошедшие в область  $R_f$  0,1–1,0, элюировали в 80% этанол, который

затем упаривали в вакууме практически досуха, а остаток перерастворяли в небольшом количестве 96% этанола и использовали для исследования в них состава ФКК методами хроматографии на бумаге (БХ), ТСХ, капиллярного микроэлектрофореза, газожидкостной хроматографии, УФ-спектроскопии. При идентификации ФКК для сравнения использовали аутентичные образцы кислот: *o*-кумаровой («Fluka», Германия); протокатеховой, ванилиновой («Serva», США); бензойной, вератровой, галловой («Реахим», Украина); *n*-кумаровой, *n*-оксибензойной, *o*-пирокатеховой, салициловой, сиреневой, феруловой («Реахим», Россия), гентизиновой («Sigma-Aldrich», США).

*Хроматография на бумаге (БХ), ТСХ.* Для деления на бумаге Filtrak №7 и Watman 1CHR, «Sigma-Aldrich» (Германия) применяли системы: 5–15%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (Б : У : В, 4 : 1 : 5, v/v),  $\text{COONa} - \text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$  (10 : 1 : 200, v/v).

Разделение методом ТСХ осуществляли в системах хлороформ – этанол (X : Э, 4 : 1, v/v) и толуол – 2,4-диоксан – уксусная кислота (Т : Д : У, 90 : 25 : 4, v/v) проводили на коммерческих алюминиевых пластинках размером 150×150 мм с нанесенным на них слоем силикагельсодержащего сорбента Silufol UV254 (Чехословакия).

Визуализацию пятен на хроматограммах проводили в видимом и УФ-свете, и УФ-свете + пары  $\text{NH}_3$ . После обведения границ флуоресцирующих пятен для обработки хроматограмм применяли ряд реагентов: диазотированные *n*-нитроанилин и сульфаниловую кислоту ( $\text{ДПНА} + \text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{ДСК} + \text{Na}_2\text{CO}_3$ ),  $\text{FeCl}_3$ , дающих специфические окраски с фенольными кислотами [6, 20]. Для УФ-спектроскопических исследований фенолкарбоновые кислоты (ФКК) элюировали (в 96% этанол) с параллельных, необработанных реагентами хроматограмм. Местоположения пятен с ФКК устанавливали по флуоресценции в УФ-свете. При этом основывались на показателях для аутентичных образцов фенольных кислот:  $R_f$ , флуоресценции в видимом и УФ-свете, окраске с реагентами.

*УФ-спектроскопические исследования.* Для веществ, элюированных с хроматограмм в 96% этанол, получали спектры поглощения в области 200–400 нм с помощью спектрофотометра S-100 Karl Zeiss (Германия). Для идентификации ФКК исследовали изменения в их спектрах под влиянием щелочных и комплексообразующих реагентов (ацетат Na, NaOH,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), сопоставляя их с соответствующими показателями изменений для аутентичных образцов ФКК.

*Метод капиллярного электрофореза.* Для исследований компонентов экстрактов из корней, фиксированных целиком, применяли систему капиллярного электрофореза G1600AX CE «Agilent Technologies» (США) с кварцевым капилляром (общая длина 48,5 см, рабочая – 40 см, внутренний диаметр 50 мкм). Для ввода пробы использовали гидродинамический способ при давлении 200 мБар. Для разделения целевых компонентов использовали рабочее напряжение 20 кВ, температуру 30 °С. В качестве рабочего использовали 20 мМ тетраборатный буфер с pH 9,3. Детектирование осуществляли с помощью диодной матрицы при длинах волн: 200, 220 нм. Идентификацию соединений в пиках проводили по УФ-ВИД спектрам поглощения, сопоставляя их со спектрами аутентичных образцов фенольных кислот.

*ГХ-МС-анализ.* Качественный анализ состава фенольных кислот в экстрактах из отрезков корней проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS «Agilent Technologies» (США). Объем вводимой пробы – 1 мкл. Температура испарителя – 250 °С, источника ионов – 230 °С, детектора – 150 °С, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, – 280 °С. Диапазон сканирования – 41–450 а.е.м. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0,50 мкм), стационарная фаза – полиэтиленгликоль, градиент температуры: от 100 до 265 °С со скоростью 3 °С/мин с выдерживанием при конечной температуре 20 мин. Газ-носитель – гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Разделение потоков 10 : 1. Детектор – квадрупольный масс-спектрометр, способ ионизации – электронный удар, энергия ионизации – 70 эВ. Анализ проводили в двух режимах: по полному ионному току (SCAN) и в режиме поиска отдельных ионов (SIM). Разделение фенольных соединений проводили после их метилирования метанолом в присутствии  $\text{H}_2\text{SO}_4$  как описано в работе [21]. Идентификацию метиловых эфиров фенольных кислот проводили по библиотеке масс-спектров NIST05 и по времени удерживания метилированных стандартных образцов фенольных кислот.

### **Обсуждение результатов**

Экстракты, содержащие фенольные кислоты, делили на 3 части для исследований с применением бумажной и тонкослойной хроматографии в комплексе с УФ-спектроскопией (1-й этап исследований), методов микроэлектрофореза (2-й этап исследований) и ГХМС-анализа (3-й этап исследований).

На первом этапе исследования состава фенольных кислот экстракты подвергали двумерному разделению на бумаге (направление I – 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , направление II – Б : У : В или  $\text{COONa} - \text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$ ). На хроматограммах выявляли области нахождения ФКК, основываясь на показателях флуоресценции в УФ-свете и  $R_f$  и тех же показателях для аутентичных образцов ФКК. Затем из областей хроматограмм, содержащих ФКК, элюировали вещества и подвергали их двумерному разделению методом ТСХ (X : Э – направление I; Т : Д : У – направление II) и после элюирования с ТСХ осуществляли УФ-спектроскопические исследования. В результате на этом этапе исследований удалось достоверно доказать присутствие в экстрактах салициловой и галловой кислот. На хроматограммах обнаруживались пятна веществ с показателями  $R_f$  и окраске с ДПНА, ДСК,  $\text{FeCl}_3$ , характерными для *n*-оксибензойной, ванилиновой, гентизиновой, *n*-кумаровой и феруловой кислот. Однако применявшиеся нами системы растворителей не позволили отделить их полностью от компонентов с близкими показателями  $R_f$  и получить для них подтверждение идентичности с соответствующими аутентичными образцами методами УФ-спектроскопических исследований.

Более широкий ряд фенольных кислот установлен методом капиллярного электрофореза. Этим методом фенольные кислоты идентифицировали путем сравнения времени миграции и УФ-ВИД-спектров в пиках на электроферограммах аутентичных образцов и исследуемых экстрактов. На рисунках 1 и 2, где представлены УФ-ВИД – спектры выявленных в экстрактах ФКК и соответствующих аутентичных образцов этих кислот, можно отметить подтверждение наличия в экстрактах всех семи фенольных кислот, найденных на первом этапе исследования с применением методов БХ и ТСХ. Наряду с этим были обнаружены бензойная и *o*-кумаровая кислоты.

Прежде чем приступить к анализу данных, полученных методом ГХ-МС, следует учесть особенности пробоподготовки перед его выполнением, которые могут приводить к гидролитическому распаду некоторых гликозидов ФКК и появлению последних в свободном виде. Гидролизу гликозидов ФКК могут способствовать кислотность и температура среды [6], которые создавались в процессе метилирования, осуществлявшемся в метаноле, содержащем 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и при нагревании до 50–60 °С.

Применение метода ГХ-МС позволило подтвердить присутствие ряда ФКК из числа обнаруженных нами на первом и втором этапах анализа. С разной степенью вероятности подтверждено присутствие в экстрактах оксикоричных кислот – *n*-кумаровой (11%), *o*-кумаровой (11%) и феруловой (38%). С большой степенью вероятности засвидетельствовано присутствие в экстрактах следующих кислот  $\text{C}_6\text{-C}_1$ -ряда: бензойная, салициловая, гентизиновая, *n*-оксибензойная. По библиотеке масс-спектров NIST05 с большой вероятностью определено наличие в экстрактах  $\zeta$ -резорциловой кислоты (рис. 3). Путь ее синтеза у растений пока не изучен. Надо полагать, что эта кислота появляется в клетках параллельно с гентизиновой при гидроксировании салициловой кислоты в результате присоединения гидроксильного радикала к бензольному кольцу, но не к 5-му, как у гентизиновой кислоты, а к 6-му атому углерода. Примечательно, что после метилирования компонентов экстрактов среди них с большой степенью вероятности (выше 72%) на ГХ-МС-хроматограммах обнаруживается вератровая кислота. Ее присутствие в экстрактах не подтверждено результатами исследований на первом и втором этапах (рис. 1). Также против ее присутствия среди эндогенных фенольных соединений у проростков гороха могут говорить факты, полученные нами при исследовании пиков на ГХ-МС-хроматограмме для аутентичных образцов протокатеховой и ванилиновой кислот, подвергнутых метилированию тем же методом, что и компоненты исследуемых нами экстрактов (см. методику). В результате после метилирования протокатеховой кислоты на хроматограммах выявлено 2 пика: для метиловых эфиров ванилиновой (вероятность 52,5%) и вератровой кислот (вероятность 92,5%). При метилировании ванилиновой кислоты обнаружены только пики, указывающие на появление метилового эфира вератровой кислоты (вероятность 92,9%). Все это дает основание говорить о наличии в составе эндогенных соединений корней проростков гороха ванилиновой, а не вератровой и не протокатеховой кислот. К тому же ванилиновая кислота обнаруживалась нами в экстрактах на первых двух этапах анализа состава ФКК, а вератровая и протокатеховая не были найдены (рис. 1). Методом ГХ-МС нам не удалось достоверно доказать присутствие галловой кислоты, обнаруженной на первом этапе исследований. В процессе метилирования аутентичного образца этой кислоты мы выявляли не менее 3-х ее производных в разной степени метилированных (наиболее полно метилированным был метиловый эфир 3,4,5-триметоксибензойной кислоты).

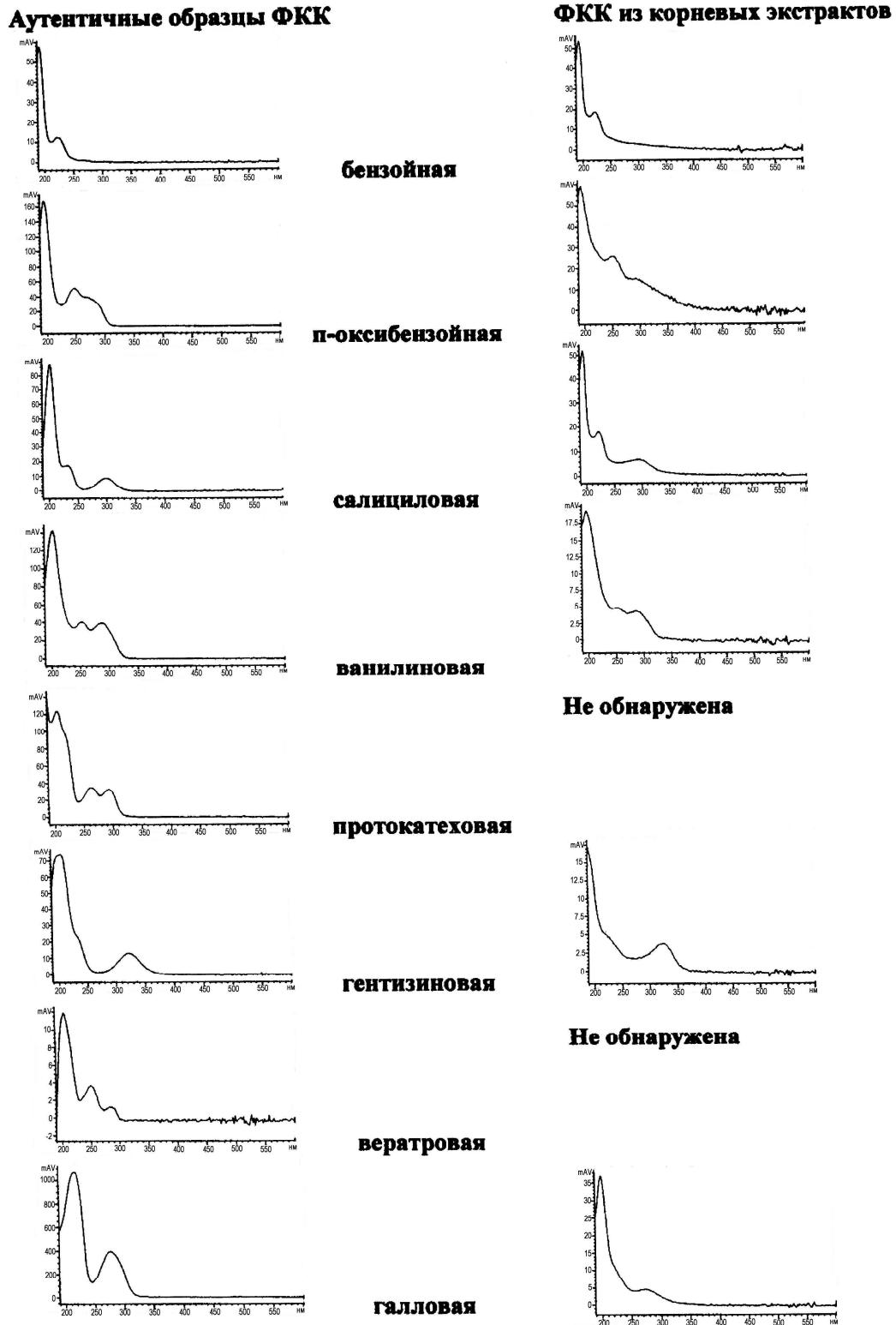


Рис. 1. УФ-спектры оксибензойных кислот (для аутентичных образцов и выделенных из корней гороха), полученные с помощью системы капиллярного электрофореза, оснащенной детектором – диодной матрицей (DAD)

Обозначения: по оси абсцисс – длина волны в нм; по оси ординат – поглощение в миллиединицах абсорбции (mAV).

## Аутентичные образцы ФКК

## ФКК из корневых экстрактов

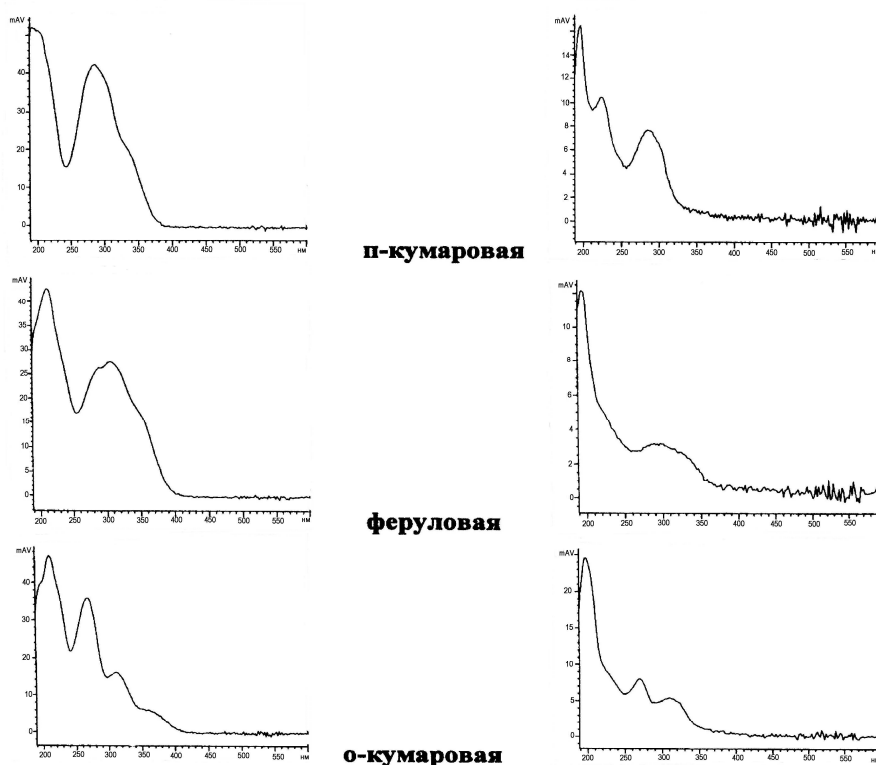


Рис. 2. УФ-ВИД-спектры оксикоричных кислот (аутентичных образцов и выделенных из корней гороха), полученные с помощью системы капиллярного электрофореза, оснащенной детектором – диодной матрицей (DAD)

Обозначения по осям абсцисс и ординат те же, что к рисунку 1.

По данным таблицы, где приведены данные ГХ-МС-анализа, можно констатировать, что все перечисленные выше кислоты одинаково присутствуют в экстрактах из корней контрольных и инокулированных *Rhizobium* проростков гороха. Однако у корней контрольных проростков гентизиновая кислота не выявлена в подавляющей части корня (см. табл.) и обнаруживается только в апикальной его части. В инокулированных корнях данная кислота распространена по всему корню, однако в одной из его частей – на расстоянии с 10 по 15 мм от кончика корня – она выявлялась только в следовых количествах.

Для объяснения феномена распределения гентизиновой кислоты по всему корню после инокуляции можно воспользоваться результатами работы [11]. Ее авторами установлено существенное возрастание уровня гентизиновой кислоты в листьях томата после инфицирования виридом (CEVd) и томатным мозаичным вирусом (ToMV), не вызывающими некрозов, но на содержание этой кислоты практически не влияло инфицирование бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, вызвавшими некрозы. Авторы связывают увеличение содержания гентизиновой кислоты с возникновением системной устойчивости. Показав, что с возрастанием концентрации гентизиновой кислоты под влиянием CEVd в листьях томата появляется группа PR-белков, они установили, что синтез этих белков может быть индуцирован гентизиновой, но не салициловой кислотой. Из чего авторы заключили, что гентизиновая кислота при системном заражении, не вызывающем некротические явления, участвует в защитной системе растения как дополнение к салициловой кислоте. Исходя из сказанного мы полагаем, что подобное увеличение концентрации гентизиновой кислоты может происходить и в корнях проростков гороха, инокулированных ризобиями, также не вызывающими некрозы. О повышении содержания этой кислоты в корневых клетках можно судить по обнаружению ее в экстрактах, полученных из всех участков корня только после его инокуляции ризобиями.

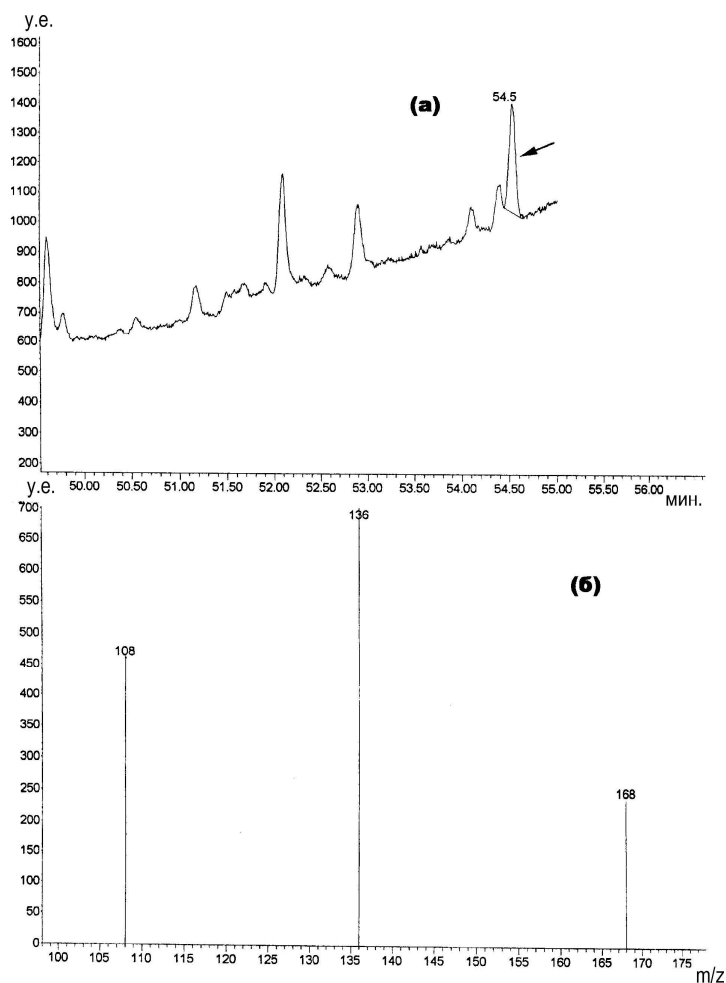


Рис. 3. Хроматографический пик (а) и фрагмент масс-спектра метилового эфира  $\zeta$ -резорциловой (2,6-диоксибензойной) кислоты (б), полученные методом ГХ-МС в режиме SIM (режим поиска отдельных ионов). Вероятность 62,5%.

*Примечание:* на рис. (а) хроматографический пик метилового эфира  $\zeta$ -резорциловой кислоты отмечен стрелкой.

ФКК, обнаруженные с помощью ГХМС-анализа экстрактов из 5 мм отрезков корней проростков гороха, инокулированных и не подверженных инокуляции (контроль) бактериями *Rhizobium*

Метилированная ФКК	Время выхода пика, мин	Номер участка корня (отсчет от апекса)	
		Контроль	Инокуляция <i>Rhizobium</i>
Бензойная	13,26-13,34	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
Гентизиновая	52,20	1	1,2,3,4,5,6,7,8
<i>n</i> -Оксибензойная	50,92-50,95	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
$\zeta$ -Резорциловая	54,33-54,56	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
Салициловая	18,18-18,26	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
Феруловая	40,2	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
<i>o</i> -Кумаровая	38,93	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8
<i>n</i> -Кумаровая	48,07-48,20	1,2,3,4,5,6,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8

Об участии ФКК, выявленных нами в корнях гороха в симбиотических взаимодействиях этого растения с ризобиями, вероятно, можно будет более обоснованно судить после получения данных об изменении их количественного содержания в связи с инокуляцией этими бактериями. В настоящее время мы можем только оперировать результатами ранее проведенных исследований, показавших повышение уровня свободной салициловой кислоты в корневых клетках после инокуляции, которое, по-видимому, отчасти происходит за счет высвобождения из ее эфиров с другими компонентами клеток [4]. Хотя возрастать содержание данной кислоты может также за счет усиления ее синтеза, который связан с ускорением синтеза бензойной кислоты [22].

Роль салициловой кислоты в реакции растений на ризобийную инфекцию достаточно активно изучается [16-18], в том числе показано ее отрицательное влияние на нодуляцию [23]. Обнаруженное в настоящей работе изменение в локализации гентизиновой кислоты в инокулированных ризобиями корнях – свидетельство ее участия в активизации защитных реакций клеток при регуляции прохождения инфекционного процесса на начальных этапах бобово-ризобийного симбиоза.

### Выводы

1. На основе результатов анализа, проведенного разными методами, можно заключить, что в составе эндогенных фенольных соединений корней проростков гороха из кислот С<sub>6</sub>-С<sub>3</sub>-ряда наличествуют *n*- и *o*-кумаровые и феруловая, а из кислот С<sub>6</sub>-С<sub>1</sub>-ряда – бензойная, *n*-оксибензойная, ванилиновая, салициловая, галловая, гентизиновая и ζ-резорциловая. За исключением ζ-резорциловой кислоты, все остальные ФКК найдены в свободной форме (доказано методами БХ, ТСХ, капиллярного электрофореза и УФ-спектроскопии). ζ-Резорциловая кислота, обнаруженная нами только методом ГХ-МС-анализа с использованием данных библиотеки масс-спектров NIST05, к числу свободных ФКК не может быть отнесена.

2. Результаты мониторинга распределения ФКК, проведенного методом ГХ-МС-анализа вдоль по корню, указывают на присутствие в корнях восьми из десяти выявленных нами кислот. Показано, что при инокуляции *Rhizobium* изменения произошли только в локализации гентизиновой кислоты. В инокулированных корнях эта кислота найдена по всей длине корня, а у контрольных растений она обнаружена только в апикальной его части. Эти различия в локализации гентизиновой кислоты являются свидетельством реакции корневых клеток на воздействие ризобий и позволяют высказать предположение о ее совместном участии с салициловой кислотой в сигнальных системах, контролирующими ответные реакции корневых клеток растений гороха на инокуляцию ризобиями.

### Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М., 1993. 272 с.
2. Schütte H.R. Secondary plant substances special topics of the phenylpropanoid metabolism // Progress in Botany. 1978. Vol. 40. Pp. 126–149.
3. Харборн Дж.Б., Симмондс Н.У. Распространение фенольных агликонов в природе // Биохимия фенольных соединений. М., 1968. С. 70–108.
4. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Лузова Г.Б., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. Влияние салициловой кислоты на симбиотические взаимоотношения гороха и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Физиология и биохимия культурных растений. 2004. Т. 36. №2. С. 124–130.
5. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобиального симбиоза // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. №4. С. 394–402.
6. Мийдла Х.И., Халдре Ы., Сависаар С. Фенолкарбоновые кислоты в листьях яблони // Ученые записки Тартуского университета. 1975. Т. 4, вып. 363. С. 3–13.
7. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М., 1974. 253 с.
8. Чигрин В.В., Розум Л.В., Запрометов М.Н. Фенолкарбоновые кислоты и лигнин в листьях устойчивых и восприимчивых сортов яровой пшеницы при заражении стеблевой ржавчиной // Физиология растений. 1973. Т. 20, вып. 5. С. 942–948.
9. Chen, Z. X., Silva, H., Klessig D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. 1993. Vol. 262, N5141. Pp. 1883–1886.
10. Alvarez M.E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Molecular Biology. 2000. Vol. 44. N3. Pp. 429–442.
11. Bellès J.M., Garo R., Fayos J., Navarro P., Primo J., Conejero V. Gentisic Acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato // MPMI. 1999. Vol. 12. N3. Pp. 227–235.
12. Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Генерация кислородных радикалов фенольными соединениями в связи с иммунитетом растений // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. Рига, 1988. С. 203–222.
13. Kawano T., Muto S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. N345. Pp. 685–693.
14. Cactelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G.P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants // FEBS Letters. 1995. Vol. 368. N1. Pp. 188–192.
15. Richmond R., Halliwell B., Chauhan J., Darbre A. Superoxide-dependent Formation of Hydroxyl Radicals: Detection of Hydroxyl Radicals by the Hydroxylation of Aromatic Compounds // Analytical Biochemistry. 1981. Vol. 118. N1. Pp. 328–335.
16. Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T., Olivares J. Involvement of Salicylic Acid in the Establishment of the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiosis // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998. Vol. 11. N2. Pp. 153–155.
17. Blilou I., Ocampo J.A., Garcia-Garrido J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid // Journal of Experimental Botany. 1999. Vol. 50. N340. Pp. 1663–1668.



18. Soto V., Sanjuán J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons // *Micribiology*. 2006. Vol. 152. N11. Pp. 3167–3174.
19. Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л., 1976. 31 с.
20. Мацек К. Проявляющие реактивы // *Хроматография на бумаге*. М., 1962. С. 719–794.
21. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // *Advances in Lipid Methodology – Two* / Ed. Christie W.W. Dundee: Oily Press, 1993. Pp. 69–111.
22. Chong J., Pierrel M.A., Atanassova R., WerckReichahart D., Fritig B., Saindrenan P. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 125. N1. Pp. 318–328.
23. Новикова Т.И. Структурно-функциональные особенности бобово-ризобияльного симбиоза : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2004. 32 с.

*Поступило в редакцию 28 октября 2015 г.*

*После переработки 14 января 2016 г.*

Makarova L.E.\*, Dudareva L.V., Sokolova N.A., Putilina T.E. THE STUDY OF INFLUENCE OF RHIZOBIUM INOCULATION ON COMPOSITION OF FREE PHENOLIC ACIDS IN ROOTS OF ETIOLATED PEA SEEDLINGS

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, ul. Lermontova, 132, Irkutsk, 664033 (Russia),  
e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

With a view to study the reaction of pea plants (*Pisum sativum* L.) by inoculation with bacteria *Rhizobium* in extracts from the roots of etiolated seedlings obtained in two stages (using 80% ethanol and ethyl acetate), studied composition free of phenolcarboxylic acids (PCA). The results of the research components of extracts by different methods (paper chromatography, TLC, capillary electrophoresis, UV- and GC-MS-spectroscopy, etc.) have classified as PCA in their free form *p*-coumaric, *o*-coumaric, ferulic, benzoic, *p*-oxybenzoic, vanillic, gallic, gentisic, salicylic acids. To him is not yet listed  $\zeta$ -resorcylic acid, detected for the first time in the root extracts using of GC-MS method. Monitoring the composition of CBF in 5-mm pieces of roots, conducted by the method of GC-MS analysis revealed the influence of inoculation only on the localization of gentisic acid. The possibility of joint participation of salicylic and gentisic acids in the induction of root cell responses to inoculation of roots with bacteria *Rhizobium* discussed.

Keywords : *Pisum sativum* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* , seedling, root, phenol-carbonic acid

### References

1. Zaprometov M.N. *Fenol'nye soedinenija: Rasprostranenie, metabolizm i funkcii v rastenijah*. [Phenolic compounds: Distribution, metabolism and function in plants]. Moscow, 1993, 272 p. (in Russ.).
2. Schütte H.R. *Progress in Botany*, 1978, vol. 40, pp. 126–149.
3. Harborn Dzh.B., Simmonds N.U. *Biohimija fenol'nyh soedinenij*. [Biochemistry of phenolic compounds]. Moscow, 1968, pp. 70–108. (in Russ.).
4. Gljan'ko A.K., Makarova L.E., Luzova G.B., Vasil'eva G.G., Mironova N.V. *Fiziologija i biohimija kul'turnyh rastenij*, 2004, vol. 36, no. 2, pp. 124–130. (in Russ.).
5. Makarova L.E., Smirnov V.I., Klyba L.V., Petrova I.G., Dudareva L.V. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 394–402. (in Russ.).
6. Mijdlja H.I., Haldre Y., Savisaar S. *Uchenye zapiski Tartuskogo universiteta*. 1975, vol. 4, no. 363, pp. 3–13. (in Russ.).
7. Kefeli V.I. *Prirodnye ingibitory rosta i fitogormony*. [Natural growth inhibitors and plant hormones]. Moscow, 1974, 253 p. (in Russ.).
8. Chigrin V.V., Rozum L.V., Zaprometov M.N. *Fiziologija rastenij*, 1973, vol. 20, no. 5, pp. 942–948. (in Russ.).
9. Chen, Z.X., Silva, H., Klessig D.F. *Science*. 1993, vol. 262, no. 5141, pp. 1883–1886.
10. Alvarez M.E. *Plant Molecular Biology*, 2000, vol. 44, no. 3, pp. 429–442.
11. Bellès J.M., Garo R., Fayos J., Navarro P., Primo J., Conejero V. *MPMI*, 1999, vol. 12, no. 3, pp. 227–235.
12. Aver'janov A.A., Lapikova V.P. *Kislorodnye radikaly v himii, biologii i medicine*. [Oxygen Radicals in Chemistry, Biology and Medicine]. Riga, 1988, pp. 203–222. (in Russ.).
13. Kawano T., Muto S. *J. Exp. Bot.* 2000, vol. 51, no. 345, pp. 685–693.
14. Cactelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G.P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. *FEBS Letters*. 1995, vol. 368, no. 1, pp. 188–192.
15. Richmond R., Halliwell B., Chauhan J., Darbre A. *Analytical Biochemistry*, 1981, vol. 118, no. 1, pp. 328–335.
16. Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T., Olivares J. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, vol. 11, no. 2, pp. 153–155.
17. Blilou I., Ocampo J.A., Garcia-Garrido J.M. *Journal of Experimental Botany*, 1999, vol. 50, no. 340, pp. 1663–1668.
18. Soto V., Sanjuán J., Olivares J. *Micriobiology*, 2006, vol. 152, no. 11, pp. 3167–3174.
19. Beresteckij V.A. *Metodicheskie rekomendacii po polucheniju novyh shtammov Rhizobium leguminosarum i ocnki ih jeffektivnosti*. [Guidelines for the preparation of new strains of *Rhizobium leguminosarum* and assess their effectiveness]. Leningrad, 1976, 31 p. (in Russ.).
20. Macek K. *Hromatografija na bumage*. [Chromatography on paper]. Moscow, 1962, pp. 719–794. (in Russ.).
21. Christie W.W. *Advances in Lipid Methodology – Two*. Dundee: Oily Press, 1993, pp. 69–111.
22. Chong J., Pierrel M.A., Atanassova R., WerckReichhart D., Fritig B., Saindrenan P. *Plant Physiol*, 2001, vol. 125, no. 1, pp. 318–328.
23. Novikova T.I. *Strukturno-funkcional'nye osobennosti bobovo-rizobial'nogo simbioza: Avtoref. diss. d.b.n.* [Structural and functional features of the *Rhizobium*-legume symbiosis: Author. diss. ... Dr.Sci.Biol]. Novosibirsk, 2004. 32 p. (in Russ.).

Received October 28, 2015

Revised January 14, 2016

\* Corresponding author.