



Изменения в содержании белков, липидов и состоянии антиоксидантной системы у мутантных форм амаранта *Amaranthus cruentus* L.

Р. М. Таипова¹, В. Н. Нестеров², О. А. Розенцвет², Б. Р. Кулуев³

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

² Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, Россия

³ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия

Автор, ответственный за переписку: Рагида Мухтаровна Таипова, Taipova.Ragida@yandex.ru

Актуальность. Одним из важных показателей пищевой ценности амаранта является высокое содержание белка и ненасыщенных жирных кислот в семенах, поэтому получение и выявление таких форм амаранта при селекции, к тому же отличающихся устойчивостью к абиотическим стрессовым факторам, является актуальным.

Материалы и методы. В работе были использованы листья и семена красного амаранта *Amaranthus cruentus* L. сорта 'Багряный', а также мутантов второго поколения инбридинга, полученных путем обработки азидом натрия. Содержание общего растворимого белка определяли методом Бредфорда, анализ липидов проводили методом тонкослойной хроматографии, состояние антиоксидантной системы определяли по активности каталазы и пероксидазы, а также скорости образования супероксид-аниона.

Результаты. Наибольшая концентрация общего белка в семенах составила 13,8 мг/г семян у мутанта № 5. В семенах амаранта было выявлено 15 жирных кислот, причем у четырех мутантов амаранта было выявлено достоверное увеличение процентного содержания омега-6-ненасыщенной линолевой кислоты. Показано увеличение солеустойчивости у мутантов № 2 и № 3 по сравнению с контролем. У мутанта № 2 при засолении выявлялась более высокая активность пероксидазы, а у мутанта № 3 – каталазы, и они оба характеризовались сниженной скоростью образования супероксид-аниона по сравнению с контролем.

Заключение. Мутанты амаранта, характеризующиеся повышенной стрессоустойчивостью, увеличенным содержанием белка и линолевой кислоты, могут быть рекомендованы для дальнейшей селекции с целью получения новых сортов этой культуры с улучшенными хозяйственно ценными признаками.

Ключевые слова: химически индуцированный мутагенез, азид натрия, липиды и жирные кислоты, линолевая кислота, общий белок, солевой стресс, каталазы, пероксидазы, супероксид-анион

Благодарности: работа выполнена в рамках госзадания при поддержке гранта Президента РФ МД-2304.2020.4. Авторы выражают благодарность Л. М. Тарановой, инженеру-исследователю лаборатории экологической биохимии ИЭВБ РАН, за техническую поддержку экспериментальной работы.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Таипова Р.М., Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Кулуев Б.Р. Изменения в содержании белков, липидов и состоянии антиоксидантной системы у мутантных форм амаранта *Amaranthus cruentus* L. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(1):76-85. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-76-85

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-76-85

Changes in the content of proteins and lipids and in the state of the antioxidant system in mutant forms of *Amaranthus cruentus* L.

Ragida M. Taipova¹, Viktor N. Nesterov², Olga A. Rozentsvet², Bulat R. Kuluev³¹ Bashkir State University, Ufa, Russia² Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, branch of Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Tolyatti, Russia³ Institute of Biochemistry and Genetics, subdivision of Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia**Corresponding author:** Ragida M. Taipova, Taipova.Ragida@yandex.ru

Background. One of the important indicators of the nutritional value of amaranth is the high content of protein and lipids in seeds. Hence, obtaining and identifying such forms of amaranth through breeding, so that they also possessed resistance to abiotic stressors, is an important task.

Materials and methods. Leaves and seeds of *Amaranthus cruentus* L. and mutants of the second inbred generation obtained by treatment with sodium azide were analyzed. The Bradford assay was used to measure the content of total soluble protein, lipid analysis was performed by thin-layer chromatography, the state of the antioxidant system was assessed according to catalase and peroxidase activities and the rate of superoxide anion formation. Mathematical data were processed using the Statistica 10.0 software.

Results. The highest concentration of total protein in seeds was 13.78 mg/g in one of the mutants obtained after treatment with 3 mM sodium azide. Fifteen fatty acids were found in amaranth seeds, and in four mutants a significant increase in the percentage of omega-6 unsaturated linoleic acid was recorded. An increase in salt tolerance compared to the control was observed in mutants No. 2 and No. 3. Mutant No. 2 under salinization demonstrated higher peroxidase activity and mutant No. 3 higher catalase activity; both mutants showed a reduced rate of superoxide anion formation compared to the control.

Conclusion. Amaranth mutants identified for higher stress resistance, protein content and linoleic acid content can be recommended for further breeding to produce new cultivars of amaranth with economically valuable traits.

Keywords: chemical mutagenesis, sodium azide, lipids and fatty acids, linoleic acid, total protein, salt stress, catalases, peroxidases, superoxide anion

Acknowledgments: this work was performed under State Task and supported by the grant from the President of the Russian Federation MD-2304.2020.4. The authors express their gratitude to L. M. Taranova, research engineer at the Laboratory of Environmental Biochemistry of the Institute of Ecology of the Volga Basin of the RAS, for technical support of the experimental work.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Taipova R.M., Nesterov V.N., Rozentsvet O.A., Kuluev B.R. Changes in the content of proteins, lipids and in the state of the antioxidant system in mutant forms of *Amaranthus cruentus* L. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(1):76-85. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-76-85

Введение

Амарант *Amaranthus cruentus* L. – это одна из недооцененных и весьма перспективных для России сельскохозяйственных культур. Данное растение используется в качестве корма для крупного рогатого скота, свиней, домашней птицы, а также в производстве косметики, лекарств и продуктов питания благодаря наличию ряда полезных соединений. Так, в листьях и зернах амаранта содержатся вещества, несущие высокую питательную ценность, и в первую очередь это белки, сбалансированные по содержанию незаменимых аминокислот. Также стоит отметить, что листья амаранта богаты рутином, аскорбиновой кислотой, щавелевой кислотой, рибофлавином, а масло семян амаранта содержит ненасыщенные жирные кислоты, токоферол, токотриенол, фитостеролы, сквален, изопреноидные соединения, алифатические спирты, терпеновые спирты, полифенолы, каротиноиды (Vysochina, 2013). Разные сорта и линии амаранта могут существенно отличаться по жирнокислотному составу масла семян, поэтому в процессе селекции этой культуры очень полезно проводить анализ липидов методом тонкослойной хроматографии (Opute, 1978).

Большая часть территории России относится к зоне рискованного земледелия, и при селекции многих культур, в том числе и амаранта, одним из важнейших отбираемых признаков является устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. При ухудшении внешних условий наблюдается не только замедление роста культурных растений, но и уменьшение содержания белка и изменение жирнокислотного состава семян, что оказывает негативное влияние на пищевые качества продукции.

Наиболее распространенными абиотическими стрессовыми факторами, ограничивающими продуктивность сельскохозяйственных культур, являются засоление почвы, засуха и низкие температуры, которые вызывают дефицит воды в клетках. В растениях, испытывающих такой абиотический стресс, образуется повышенное количество активных форм кислорода (АФК): супероксида, синглетного кислорода, гидроксильных радикалов, перекиси водорода (H_2O_2) (Hasanuzzaman et al., 2011). АФК обладают высокой реакционной способностью, повреждая белки и нуклеиновые кислоты, изменяют клеточный метаболизм, а также вызывают перекисное окисление липидов мембран. Предотвратить их отрицательное воздействие растениям удается благодаря наличию в них ферментативных и неферментативных систем детоксикации АФК, включающим в себя различные ферменты, в том числе каталазы (КАТ) и пероксидазы (ПО), а также неферментативные соединения, такие как аскорбат, глутатион, каротиноиды и токоферолы (Hasanuzzaman et al., 2011). Регулируемый баланс между образованием и разрушением кислородных радикалов остается необходимым условием для поддержания метаболической активности и функционирования клеток растений. Показано, что метаболические процессы, снижающие окислительный стресс, играют важную роль в способности сохранить жизнедеятельность растений, а значит и урожайность, в стрессовых условиях, в частности при засолении, засухе и гипотермии (Benavides et al., 2000). Таким образом, определение активности ПО и КАТ, а также скорости образования супероксид-аниона (СА) может служить одним из подходов для лабораторной оценки стрессоустойчивости анализируемых растений.

Для создания новых сортов амаранта используется мутационная селекция, позволяющая улучшить сорта путем изменения одной или нескольких характеристик и при этом сохранить основные его первоначальные признаки. На сегодняшний день известными сортами амаранта, полученными методом мутационной селекции, являются 'Centenario' в Перу, 'New Asutake' в Японии, 'Степх' на Украине, 'Pribina' и 'Zobor' в Словакии (Gómez-Pando et al., 2009; Das, 2016). В целом индуцированный мутагенез остается широко и успешно используемым методом генетического улучшения качественных и количественных признаков растений. В качестве эффективного средства повышения урожайности и качества культурных растений чаще всего применяется химический мутагенез, в том числе при помощи азидата натрия (NaN_3) (Elfe-ky et al., 2014).

Ранее с использованием азидата натрия нами были получены мутантные формы амаранта *A. cruentus*, которые характеризовались улучшенными параметрами роста по сравнению с диким типом (Таипова, Кулуев, 2021). Однако содержание белка, жирнокислотный состав семян, а также стрессоустойчивость этих мутантных линий оставались неисследованными.

Поэтому целью нашей работы являлось определение содержания общего белка, жирнокислотного состава, активности КАТ и ПО, скорости образования СА у мутантных форм амаранта *A. cruentus*, полученных путем обработки азидом натрия.

Материалы и методы

В работе были использованы семена растений амаранта *A. cruentus* сорта 'Багряный' («Агросервер», Россия) второго мутантного поколения (M_2), полученные нами ранее в ходе экспериментов по индуцированному мутагенезу азидом натрия (Таипова, Кулуев, 2021). Так, были получены мутанты № 1 – № 7, после обработки 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ азидом натрия соответственно. Для определения антиоксидантного статуса мутантных форм амаранта семена проращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл с универсальным грунтом "Terra vita" в лабораторных условиях при интенсивности света 350 мкмоль/м² с, температуре +25°C, длине дня 16 часов. Полив осуществляли каждые 2 дня дистиллированной водой (50 мл) в течение одного месяца. Солевой стресс создавали путем двухнедельного полива растений 2-процентным раствором NaCl 2 раза в неделю (итого 4 раза). Состояние антиоксидантной системы исследовали на листьях мутантов № 2 и № 3 в сравнении с контролем (необработанная мутагеном линия).

Определение содержания общего растворимого белка

Содержание общего растворимого белка определяли по методу Bradford (1976). Экстрагирующий раствор состоял из 50 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,0), 0,1 мМ ЭДТА, 0,1% Тритона X-100, 10 мМ меркаптоэтанол.

Анализ липидов и жирных кислот

Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1 : 2) с одновременным механическим разрушением тканей (Kates, 1975). Разделение липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Количество мембранных фосфолипидов (ФЛ) и запасных нейтральных липидов (НЛ) определяли денситометрическим методом, используя программу «Денскан-04» («Ленхром», Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по градуировочным зависимостям, используя фосфатидилхолины (ФХ), спирты и стеринны (СТ) в качестве стандартов.

Метанолит жирных кислот (ЖК) осуществляли кипячением в 5-процентном растворе HCl в метаноле. Полученные эфиры анализировали на хроматографе «Кристалл 5000.1» («Хроматэк», Россия) в изотермическом режиме с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0,25 мм RESTEK (США). Температура колонки – 180°C, испарителя и детектора – 260°C, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин.

Определение активности каталаз

КАТ экстрагировали в смеси Серенсена (50 мМ рН = 7,0) с добавлением тритона X-100 (0,1%) и ЭДТА (0,1 мМ) (Panchuck et al., 2002). Реакционная смесь включала 100 мкл супернатанта и 2 мл 0,15-процентного раствора H₂O₂. Реакцию останавливали через 10 мин путем добавления 1 мл 4-процентного раствора молибдата ам-

зультаты представлены в виде средних значений параметра и их стандартных ошибок. Расчеты выполняли, используя программы Statistica 10.0, Microsoft Excel 2003. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна – Уитни.

Результаты

У всех проанализированных мутантов был выявлен достоверно более высокий уровень содержания белка в семенах, чем в контроле (рис. 1). К примеру, у мутанта № 5 было зафиксировано наибольшее количество белка, в среднем 13,78 мг/г, в то время как для контрольного варианта этот показатель составил в среднем 9,04 мг/г (см. рис. 1).

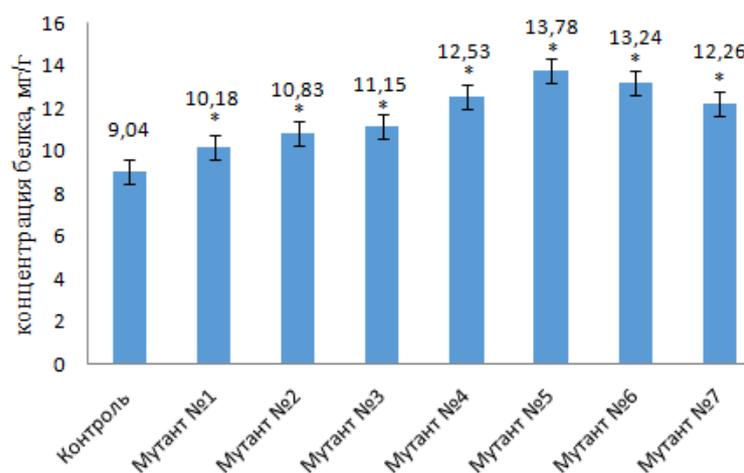


Рис. 1. Концентрация общего белка у мутантов *Amaranthus cruentus* L. (ось X – мутанты амаранта; ось Y – концентрация белка, мг/г семян)

Fig. 1 Concentration of total protein in the mutants of *Amaranthus cruentus* L. (the X-axis shows amaranth mutants; the Y-axis shows total protein concentrations in seeds, mg/g)

мония (Levitana et al., 1978). Измерения проводили при 410 нм. Активность КАТ вычисляли относительно оптической плотности холостой пробы.

Определение активности пероксидаз

Активность ПО определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола, которая сопровождается увеличением оптической плотности реакционной смеси. Пероксидазы экстрагировали так же, как и каталазы. Измерение проводили в фосфатном буфере, содержащем 11 мМ H₂O₂ и 9 мМ гваякола при 436 нм через каждые 20 секунд после запуска реакции (Ermakov et al., 1987).

Определение скорости образования супероксид-аниона

Скорость образования СА определяли акцепторным методом, основанным на определении окрашенного продукта окисления адреналина – аденохрома (Minibaeva et al., 2001). Навеску свежих листьев (100 мг) помещали в 10 мл 0,1-процентного раствора тритона X-100 (Panchuck et al., 2002). Доливали раствор адреналина (11 мМ адреналина и 30 мкМ HCl, рН = 7,0) до конечной концентрации адреналина 1 мМ. После 60 минут реакцию останавливали добавлением 150 мкл 0,5 М HCl и измеряли оптическую плотность при 490 нм относительно 1 мМ раствора адреналина-гидрохлорида.

Статистический анализ

Анализ каждого компонента проводили трижды в каждой параллельной пробе. На рисунках и таблицах пре-

По результатам исследований нейтральных липидов (НЛ) семена амаранта преимущественно состоят из триацилглицеролов и жирных кислот, остальная часть НЛ представлена стеринами и их эфирами. Наибольшее накопление НЛ (40,8 мг/г) было выявлено у мутанта № 1. Для данного мутанта было характерно также максимальное содержание триацилглицеролов в сравнении с остальными мутантами *A. cruentus* (табл. 1). Достоверно повышенное по сравнению с контролем содержание НЛ, триацилглицеролов и эфиров было характерно для мутантов № 1, № 3, № 4 и № 7.

В составе ЖК семян амаранта нами было идентифицировано 15 компонентов, среди которых преобладали линолевая (18:2), олеиновая (18:1), пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0) кислоты. Действие всех испытанных концентраций азида натрия в конечном счете приводило к увеличению содержания линолевой кислоты у мутантов по сравнению с контролем. Максимальные значения содержания линолевой кислоты выявлены у четырех мутантов амаранта: № 1, № 4, № 6 и № 7, полученных обработкой 0,1 мМ, 2 мМ, 4 мМ и 5 мМ раствором азида натрия соответственно, и составили 50% от суммы всех ЖК. При этом увеличивалось относительное содержание пальмитиновой кислоты от 17,8% в контроле до 19,9% в опытных вариантах. Кроме того, у мутантов наблюдали достоверное снижение содержания олеиновой и стеариновой кислот (табл. 2).

Таблица 1. Общее содержание нейтральных липидов в семенах мутантов амаранта (*Amaranthus cruentus* L.), мг/г**Table 1.** Total content of neutral lipids in the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) mutants, mg/g

Образец / Sample	Контроль / Control	Мутант № 1 / Mutant No. 1	Мутант № 2 / Mutant No. 2	Мутант № 3 / Mutant No. 3	Мутант № 4 / Mutant No. 4	Мутант № 5 / Mutant No. 5	Мутант № 6 / Mutant No. 6	Мутант № 7 / Mutant No. 7
Сумма НЛ, мг липидов/г семян	29,4 ± 0,2	40,8 ± 0,1	28,0 ± 0,2	33,6 ± 0,1	36,2 ± 0,2	26,6 ± 0,1	27,7 ± 0,1	34,7 ± 0,1
Триацилглицеролы	25,7 ± 0,1	36,1 ± 0,1	24,2 ± 0,1	29,1 ± 0,1	30,9 ± 0,1	23,4 ± 0,1	23,7 ± 0,1	30,6 ± 0,1
Эфиры	1,6 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Стерины	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Примечание: критерий достоверности – $p < 0.01$. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$

Note: the criterion for statistical significance is $p < 0.01$. Here and further the results are presented in the form of $M \pm SEM$

Таблица 2. Состав и содержание жирных кислот в семенах мутантных форм амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) (% от суммы)**Table 2.** Composition and content of fatty acids in the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) mutants (% of the total)

Состав жирных кислот / Composition of fatty acids	Контроль / Control	Мутант № 1 / Mutant No. 1	Мутант № 2 / Mutant No. 2	Мутант № 3 / Mutant No. 3	Мутант № 4 / Mutant No. 4	Мутант № 5 / Mutant No. 5	Мутант № 6 / Mutant No. 6	Мутант № 7 / Mutant No. 7
Насыщенные:								
Миристиновая	0,3 ± 0,2	0	0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0
Пентадекановая	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Пальмитиновая	17,8 ± 0,5	19,4 ± 0,5	19,7 ± 0,6	19,7 ± 0,5	19,7 ± 0,2	19,6 ± 0,7	19,6 ± 0,6	19,9 ± 0,8
Маргариновая	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Стеариновая	5,1 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,4	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,2
Арахидиновая	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1
Бегеновая	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Лигноцериновая	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3
Мононенасыщенные:								
Пальмитолеиновая	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3
Гептадеценная	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2
Олеиновая	32,5 ± 2,2	22,3 ± 0,3	23,2 ± 0,1	23,3 ± 0,2	21,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	21,8 ± 0,2	21,6 ± 0,1
Эйкозеновая	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3	0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Полиненасыщенные:								
Линолевая	40,4 ± 1,5	50,0 ± 0,9	48,5 ± 0,6	49,0 ± 1,1	50,0 ± 1,3	47,9 ± 1,2	50,0 ± 1,6	50,0 ± 1,6
Линоленовая	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Гексадекадиеновая	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1

Примечание: критерий достоверности – $p < 0.01$

Note: the criterion for statistical significance is $p < 0.01$

В предыдущей работе, связанной с индуцированным мутагенезом, исходя из результатов морфометрического анализа, нами была определена оптимальная концентрация азидата натрия для обработки семян амаранта *A. cruentus*; она лежит в диапазоне 0,5–1,0 мМ (Таипова, Kuluev, 2021). Поэтому дальнейшие работы вели с мутантами амаранта, полученными путем обработки 0,5–1,0 мМ азидата натрия (мутанты № 2 и № 3).

Содержание ФЛ во всех проанализированных мутантах составило от 8,3 до 10,1 мг липидов/г семян. Фракционный состав ФЛ зерен амаранта содержал следующие компоненты: фосфатидилхолины до 5,0, фосфатидилэтаноламины до 2,5, фосфатидилинозиты до 2,4 мг/г. Достоверное увеличение по сравнению с контролем было выявлено по содержанию ФЛ и фосфатидилэтаноламина для мутанта № 3. Контроль и мутант № 2 достоверно не отличались по большинству компонентов ФЛ (табл. 3).

Обсуждение результатов

Важной целью применения методов индуцированного мутагенеза в экспериментально-исследовательских работах с культурными растениями является повышение количества и качества урожая зерна. При оценке питательных качеств семян амаранта большое значение уделяется содержанию белка. Помимо этого, важным параметром является содержание и состав ЖК в нейтральных и полярных липидах (Los, 2014). Показано, что зерно амаранта на 61,3–76,5% состоит из углеводов, представленных в основном крахмалом, 13,1–21,5% приходится на сырой белок, 5,6–10,9% – на сырой жир, 2,7–5% – на сырую клетчатку и 2,5–4,4% – на золу (Mlakar et al., 2009). Однако не вызывает сомнения, что селекционными методами могут быть получены сорта амаранта, существенно отличающиеся по составу основных питательных

Таблица 3. Содержание фосфолипидов в семенах амаранта (*Amaranthus cruentus* L.), мг/г
Table 3. Content of phospholipids in the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.), mg/g

Образец / Sample	Контроль / Control	Мутант № 2 / Mutant No. 2	Мутант № 3 / Mutant No. 3
Сумма ФЛ, мг липидов/г семян	8,3 ± 0,8	9 ± 0,1	10,1 ± 0,2
Фосфатидилхолин	4,1 ± 0,4	4,4 ± 0,2	5,0 ± 0,3
Фосфатидилэтаноламин	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Фосфатидилинозитол	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2
Фосфатидилглицерол	0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

Примечание: критерий достоверности – $p < 0.01$

Note: the criterion for statistical significance is $p < 0.01$

Интересно отметить, что лишь у мутантов был обнаружен фосфатидилглицерол, тогда как у контроля он не выявлялся.

Путем обработки проростков 2-процентным раствором NaCl растения мутантов № 1 и № 2 были проверены на устойчивость к солевому стрессу. У обоих мутантов показатель активности КАТ был достоверно выше по сравнению с контролем как при нормальных условиях, так и при засолении (рис. 2, а). То же самое было выявлено при определении активности ПО (рис. 2, б). Причем у мутанта № 2 данный показатель был наиболее высоким. Исходя из этих данных, можно полагать, что он обладает более высокой способностью к быстрому разложению H_2O_2 и соответственно большей стрессоустойчивостью. При воздействии соли у мутантных растений наблюдалась низкая скорость образования СА по сравнению с контролем, что является еще одним подтверждением их большей устойчивости к солевому стрессу (рис. 2, в).

Таким образом, солевой стресс приводил к увеличению активности КАТ и ПО у контрольной линии амаранта (см. рис. 2, а, б), а у мутантов активность антиоксидантных ферментов была изначально высокой и при засолении достоверно не увеличивалась. Все это, плюс низкая скорость образования СА у мутантов при засолении, вероятнее всего, отражает их более высокую стрессоустойчивость.

компонентов. Получение ценного селекционного растительного материала амаранта с последующим отбором по желаемым признакам с помощью методов мутагенеза проводились и ранее, например М. Kečkešová et al. (2012). Так, им удалось путем воздействия гамма-излучения создать мутантные формы *A. hypochondriacus* и *A. cruentus*, содержащие на 2% больше белка по сравнению с необработанными линиями. Влияние гамма-излучения на качество семян сортов амаранта описал также Е. V. Gudym (2018), при этом он отметил положительное и отрицательное влияние доз гамма-излучения на содержание белка в семенах мутантных форм амаранта. На основе исследований белка в семенах мутантных растений *A. cruentus* нами было установлено, что обработка азидом натрия способствует увеличению его концентрации на 52% у одной из мутантных форм, что существенно превышает описанные в литературе результаты. Поэтому мутант № 5 может быть использован в дальнейшей селекции для получения новых высокобелковых сортов амаранта. Особый интерес представляет вопрос о сохранении таких высоких показателей содержания белка в последующих поколениях, ответ на который мы планируем получить в ходе наших дальнейших исследований. Мутагенез может стать эффективным подходом не только для изменения содержания белка, но и липидного и ЖК состава семян многих культурных растений (Rückler, Röbbelen, 1997). Основным компонентом липидной

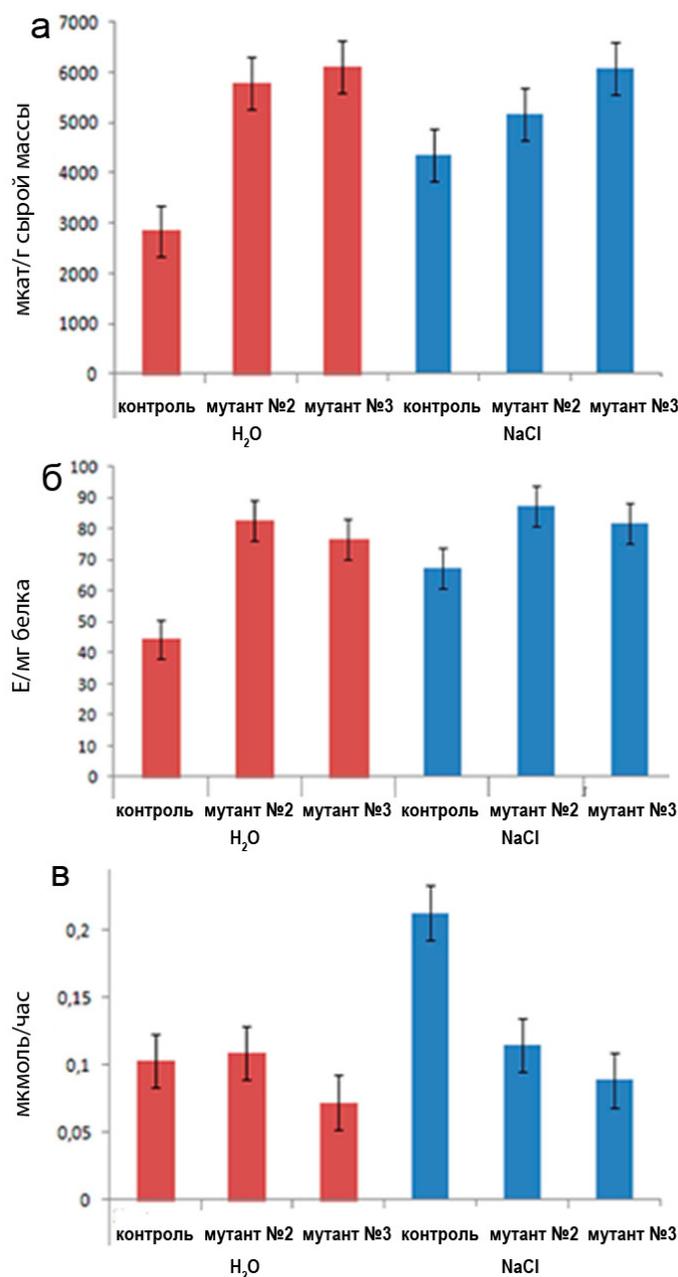


Рис. 2. Активность каталаз, пероксидаз и скорость образования супероксид-аниона в листьях мутантных форм амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) при действии солевого стресса: **а** – активность каталаз; **б** – активность пероксидаз; **в** – скорость образования супероксид-аниона

Fig. 2 Catalase and peroxidase activity, and rate of superoxide anion formation in the leaves of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) mutant forms in response to salt stress: **а** – catalase activity; **б** – peroxidase activity; **в** – rate of superoxide anion formation

фракции масла семян амаранта являются триацилглицериды (около 80%), что представляет собой основное депо ЖК, остальная часть приходится на второстепенные соединения, такие как сквален, стерины, токоферолы, каротиноиды, фосфолипиды. Содержание ФЛ, включающих в себя фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолмин и фосфатидилинозит, в масле семян амаранта находится в диапазоне 9,1–10,2% от общего количества липидов (Gamel et al., 2007). Фосфолипиды играют в клетках множество ролей: помимо создания барьеров проницаемости, они служат субстратом или составной частью мембраносвязанных ферментов, участвуют в синтезе

макромолекул, действуют как молекулярные сигналы, влияющие на метаболические события и др. (Becker et al., 1981). В семенах мембранные ФЛ и НЛ являются источником ЖК. Именно НЛ, в особенности триацилглицериды, являются энергетическим и строительным резервом живых клеток. Поэтому важно в семенах анализируемых растений определять также содержание фосфолипидов и их отдельных компонентов.

У мутантов амаранта нами было зафиксировано увеличение содержания НЛ на 38% и линолевой кислоты на 23% по сравнению с контролем. Модификация биосинтеза ЖК позволяет получить масла с заданными физичес-

кими свойствами и пищевой ценностью. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) амаранта являются перспективным функциональным компонентом в пищевой промышленности. Увеличение содержания линоленовой кислоты в семенах будет способствовать повышению полезных свойств амарантового масла и его использованию в пищевых и медицинских целях. Поэтому все проанализированные мутанты амаранта могут быть использованы в селекции сортов с повышенным содержанием линоленовой кислоты в семенах.

Полученные нами данные показывают также, что мутанты амаранта могут обладать повышенной устойчивостью к абиотическим факторам среды. На примере солевого стресса у отдельных мутантов выявлена модуляция ферментов антиоксидантной защиты. Засоление – один из актуальных абиотических стрессовых факторов, снижающих рост и продуктивность растений, в том числе за счет индукции окислительного стресса (Evgrashkina et al., 2020). Окислительный стресс характеризуется избыточным образованием АФК, которые ответственны за окислительное повреждение клеток (Foyer, Noctor, 2003). Из-за дисбаланса в образовании и разрушении АФК, в особенности таких, как супероксид-анион и перекись водорода, при солевом стрессе наблюдается увеличение их концентрации (Asada, 1994). Супероксидный радикал не может проникать через биологические мембраны и расщепляется до H_2O_2 супероксиддисмутазой (Aydin et al., 2013). Различные экологические стрессы индуцируют накопление H_2O_2 , уровень которого ферментативно регулируется рядом КАТ и ПО, локализованных практически во всех компартментах растительной клетки (Blokhina et al., 2003).

Обнаруженная нами повышенная активность КАТ у мутантов служит адаптивным механизмом для снижения содержания H_2O_2 и обеспечивает защиту от окислительного повреждения клеток (Agarwal, Pandey, 2004). К примеру, у *Phaseolus vulgaris* L. повышенная активность КАТ была ассоциирована с эффективностью разложения H_2O_2 и толерантностью к соли (Nagesh, Devaraj, 2008). Увеличение активности ПО и изменение скорости образования СА также служит подтверждением солеустойчивости мутантов № 2 и № 3 амаранта и согласуется с данными, полученными для солеустойчивых видов томатов (Коса et al., 2006), риса (Dionisio-Sese, Tobita, 1998) и многих других культур. Более того, полученные нами данные говорят о возможных генетических механизмах повышенной стрессоустойчивости мутантных растений амаранта через модуляцию активности ферментов антиоксидантной системы.

Заключение

Мутантные формы амаранта поколения M_2 , полученные при помощи азиды натрия, характеризовались увеличением содержания белка и изменениями в составе липидов в семенах. Установлено максимальное увеличение содержания белка в семенах мутантного амаранта на 52%, а линоленовой кислоты на 25% по сравнению с контролем. При этом мутантные растения характеризовались повышенной активностью КАТ и ПО, а также уменьшением скорости образования СА, что может говорить об их большей стрессоустойчивости по сравнению с контрольной линией. Полученные нами мутантные формы амаранта являются перспективными для дальнейшей селекции с целью выведения новых сортов этой культуры с заданными хозяйственно ценными признаками.

References / Литература

- Agarwal S., Pandey V. Antioxidant enzyme response to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*. 2004;48(4):555-560. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000047152.07878.e7
- Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. New York, NY: CRC Press; 1994. p.78.
- Aydin S.S., Büyüç I., Aras S. Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(3):3220-3229. DOI: 10.4238/2013.august.29.6
- Becker R., Wheeler E.L., Lorenz K., Stafford A.E., Grosjean O.K., Betschart A.A. et al. A composition study of amaranth grain. *Journal of Food Science*. 1981;46(4):1175-1180. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb03018.x
- Benavides M.P., Marconi P.L., Gallego S.M., Comba M.E., Tomaro M.L. Relationship between antioxidant defense system and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 2000;27(3):273-278. DOI: 10.1071/PP99138
- Blokhina O., Virolainen-Arne E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 2003;91(2):179-194. DOI: 10.1093/aob/mcf118
- Bradford M.M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Das S. Amaranthus: a promising crop of future. Singapore: Springer; 2016. DOI: 10.1007/978-981-10-1469-7
- Dionisio-Sese M.L., Tobita S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*. 1998;135(1):1-9. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00025-9
- Elfeky S., Abo-Hamad S., Saad-Allah K.M. Physiological impact of sodium azide on *Helianthus annuus* seedlings. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 2014;4(5):102-109.
- Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Peruanskiy Yu.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. Methods of biochemical research in plants (Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy). A.I. Ermakov (ed.). 3rd ed. Leningrad: Agropromizdat; 1987. [in Russian] (Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. 3-е изд. Ленинград: Агропромиздат; 1987).
- Evgrashkina T.N., Ivanishchev V.V., Boykova O.I., Zhukov N.N. Induction of oxidative stress with carbonate salinization in triticale seedlings. *Russian Agricultural Sciences*. 2020;(1):11-14. [in Russian] (Евграшкина Т.Н., Иванищев В.В., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Индукция окислительного стресса карбонатным засолением в проростках тритикале. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2020;(1):11-14). DOI: 10.31857/S2500-2627-2020-1-11-14
- Foyer C.H., Noctor G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 2003;119(3):355-364. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x
- Gamel T.H., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A., Linsen J.P. Characterization of amaranth seed oils. *Journal of Food Lipids*. 2007;14(3):323-334. DOI: 10.1111/j.1745-

- 4522.2007.00089.x
- Gómez-Pando L., Eguiluz A., Jimenez J., Falconí J., Heros Aguilar E. Barley (*Hordeum vulgare*) and Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) improvement by mutation induction in Peru. In: Q.Y. Shu (ed.). *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Rome: FAO; 2009. p.330-332.
- Gudym E.V. Description of mutant amaranth forms according to grain quality (Kharakteristika mutantnykh form amaranta po kachestvu zerna). *Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy*. 2018;(1):113-117. [in Russian] [Гудым Е.В. Характеристика мутантных форм амаранта по качеству зерна. *Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. 2018;(1):113-117].
- Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Teixeira da Silva J.A., Fujita M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: B. Venkateswarlu, A.K. Shanker, C. Shanker, M. Maheswari (eds). *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies*. Dordrecht: Springer; 2011; 261-315. DOI:10.1007/978-94-007-2220-0_8
- Kates M. Techniques of lipidology: Isolation, analysis, and identification of lipids. Transl. from Eng. by V. Vaver. Moscow: MIR; 1975. [in Russian] [Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / пер. с англ. В. Вавера. Москва: МИР; 1975].
- Kečkešová M., Gálová Z., Hricová A. Changes in protein profile in amaranth mutant line. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012;1:1129-1135.
- Koca H., Ozdemir F., Turkan I. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum*. 2006;50(4):745-748. DOI: 10.1007/s10535-006-0121-2
- Levitana T.P., Lipskaya A.A., Dmitrieva E.Yu. Methods for biochemical analysis of plants (Metody biokhímicheskogo analiza rasteniy). Leningrad: Leningrad State University; 1978. [in Russian] [Левитана Т.П., Липская А.А., Дмитриева Е.Ю. Методы биохимического анализа растений. Ленинград: ЛГУ; 1978].
- Los D.A. Fatty acid desaturases. Moscow: Scientific World; 2014. [in Russian] [Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. Москва: Научный мир; 2014].
- Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*. 2001;217(1-3):125-128. DOI: 10.1007/BF01289421
- Mlakar S.G., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*. 2009;6(2):43-53.
- Nagesh Babu R., Devaraj V.R. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*. 2008;2(2):40-48.
- Opute F.I. Seed lipids of the grain amaranths. *Journal of Experimental Botany*. 1978;30(3):601-606. DOI: 10.1093/jxb/30.3.601
- Panchuck I.I., Volkov R.A., Schöff F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2002;129(2):838-853. DOI: org/10.1104/pp.001362
- Rücker B., Röbbelen G. Mutants of *Brassica napus* with altered seed lipid fatty acid composition. In: J.P. Williams, M.U. Khan, N.W. Lem (eds). *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. Dordrecht: Springer; 1997. p.316-318. DOI: 10.1007/978-94-017
- Taipova R.M., Kuluev B.R. Determination of the optimal concentration of mutagen sodium azide for *Amaranthus cruentus* L. seed treatment. *Vestnik of Voronezh State Agrarian University. Series: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2021;(3):34-41. [in Russian] [Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Определение оптимальной концентрации мутагена азидата натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* L. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, биология, фармацевтика*. 2021;(3):34-41].
- Vysochina G.I. Amaranth (*Amaranthus* L.): chemical composition and prospects of using (review). *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2013;(2):5-14. [in Russian] [Высочина Г.И. Амарант (*Amaranthus* L.): химический состав и перспективы использования (обзор). *Химия растительного сырья*. 2013;(2):5-14].

Информация об авторах

Рагида Мухтаровна Таипова, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета, Башкирский государственный университет, 450076 Россия, Уфа, ул. Заки Валиди, 32, Taipova.Ragida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0385-4867>

Виктор Николаевич Нестеров, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, 445003 Россия, Тольятти, ул. Комзина, 10, nesvik1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3590-7097>

Ольга Анатольевна Розенцвет, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, 445003 Россия, Тольятти, ул. Комзина, 10, olgarozen55@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6312-3620>

Булат Разяпович Кулуев, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Information about the authors

Ragida M. Taipova, postgraduate student, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biology, Bashkir State University, 32 Zaki Validi St., Ufa 450074, Russia, Taipova.Ragida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0385-4867>

Viktor N. Nesterov, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, branch of Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, 10 Komzina St., Tolyatti, 445003, Russia, nesvik1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3590-7097>

Olga A. Rozentsvet, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, branch of Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, 10 Komzina St., Tolyatti 445003, Russia, olgarozen55@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6312-3620>

Bulat R. Kuluev, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Institute of Biochemistry and Genetics, subdivision of Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 20.09.2021; одобрена после рецензирования 16.12.2021; принята к публикации 28.02.2022.

The article was submitted on 20.09.2021; approved after reviewing on 16.12.2021; accepted for publication on 28.02.2022.