

УДК 577.13

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ У *OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS. (СОРТ «РАННИЙ ЧЕРНЫЙ») В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

© Е.В. Березина, А.А. Брилкина

Проведен анализ содержания фенольных соединений (суммы растворимых фенольных соединений, флавоноидов, катехинов) у интактных, стерильных растений и каллусов клюквы крупноплодной сорта «Ранний черный». Выявлено, что количество флавоноидов и катехинов у микрорастений не уступает минимальному их количеству у растений открытого грунта; недифференцированные каллусные ткани накапливают значительно меньше фенолов, чем дифференцированные растительные ткани в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: клюква крупноплодная, фенолы, флавоноиды, катехины, *in vitro*, каллусы.

Фенольные соединения присутствуют во всех тканях растений и проявляют высокую биологическую активность, поэтому находят применение в пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Более широкому использованию фенолнакапливающих видов растений в официальной медицине должна способствовать доступность сырья – источника для получения биологически активных веществ. Введение растений в культуру может способствовать решению этой задачи. Важными этапами в таких работах является поиск растений, богатых целевыми веществами, выявление факторов, влияющих на их биохимический профиль, подбор условий культивирования и сравнительное изучение количества интересующих соединений в растениях открытого грунта и культурах, выращенных в условиях *in vitro*.

К растениям, богатым фенолами, относится клюква (*Oxycoccus* Hill.). Наиболее распространенными видами данного рода являются клюква болотная (*O. palustris* Pers.) и крупноплодная (*O. macrocarpus* (Ait.) Pers.). Цель настоящей работы – сравнить содержание фенольных соединений у клюквы крупноплодной, культивируемой в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы исследования.

Объектами исследования являлись листья интактных и стерильных растений клюквы крупноплодной сорта «Ранний черный», а также каллусы. Листья интактных растений собирали в НИИ Ботанический сад ННГУ им. Н.И. Лобачевского с 2010 по 2012 год. Из пазушных почек интактных растений получили стерильные микрорастения, которые выращивали на питательной среде Андерсона. Каллусы, полученные из листьев стерильных растений, культивировали на среде Андерсона, дополненной регуляторами роста в следующих сочетаниях: 1) α -нафтилуксусная кислота (НУК) и кинетин (Кин), 2) НУК и 6-бензил-аминопурин (БАП), 3) 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и Кин, 4) 2,4-Д и БАП (в концентрациях по 0,5 мг/л). Часть эксплантов инкубировали на свету, часть – в темноте. Длительность пассажа – 4 недели.

Содержание суммы растворимых фенольных соединений и катехинов определяли согласно методике, описанной М.Н. Запрометовым [2], флавоноидов – G. Gunes, R.H. Liu и С.В. Watkins [3] с использованием спектрофотометра UV-1700 (Shimadzu).

Результаты и их обсуждение. Выбранные нами растения клюквы интересны тем,

БЕРЕЗИНА Екатерина Васильевна, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: berezina_ek@52.ru

БРИЛКИНА Анна Александровна – к.б.н., Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: annbril@mail.ru

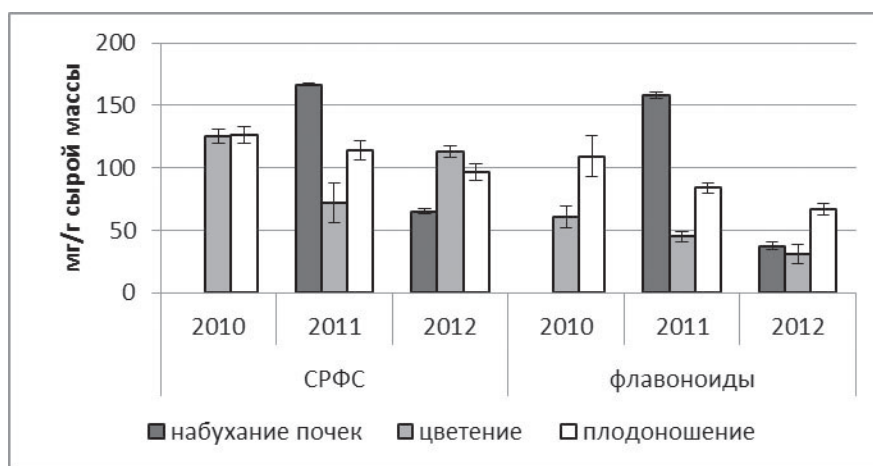


Рис. 1. Содержание СРФС и флавоноидов в листьях клюквы крупноплодной в 2010–2012 гг.

что они были получены микрклональным способом и высажены в открытый грунт в 2008 г. Известно, что окончательное вступление культуры клюквы в репродуктивный период развития происходит лишь на 4 год вегетации, и, следовательно, метаболизм в предшествующую вегетативную фазу в значительной мере определяют количественные и качественные показатели будущего урожая ягодной продукции [4].

Как показали результаты исследования, динамика накопления суммы фенолов, флавоноидов и катехинов в каждый год вегетации имеет свои особенности (рис. 1–2). Так, в 2010 г. между фенофазам не наблюдалось статистически значимых отличий в содержании СРФС, тогда как флавоноидов – и особенно катехинов – накапливалось значительно больше в осенних листьях, чем в летних (соответственно в 1,8 и 2,6 раза). Необходимо отметить, что по погодным условиям лето 2010 г. отличалось сухой и жаркой погодой в июле–августе (период созревания ягод у клюквы). Следовательно, флавоноиды выполняют ярко выраженную экологическую функцию, т.к. синтез их как ингибиторов роста и УФ-фильтров резко увеличился в стрессовых условиях.

В 2011 г. в период набухания почек был зафиксирован максимум в содержании (мг/г сырой массы) СРФС (167), флавоноидов (158) и катехинов (41) как за год вегетации, так и за весь многолетний цикл исследования. Очевидно, повышенный уровень фенолов в рас-

сматриваемый период может быть обусловлен следующими причинами: значительным содержанием этих веществ в листьях, собранных осенью предыдущего года; усилением биосинтетических процессов в конце плодоношения или зимой; повышением концентрации продуктов деградации лигнинов [5].

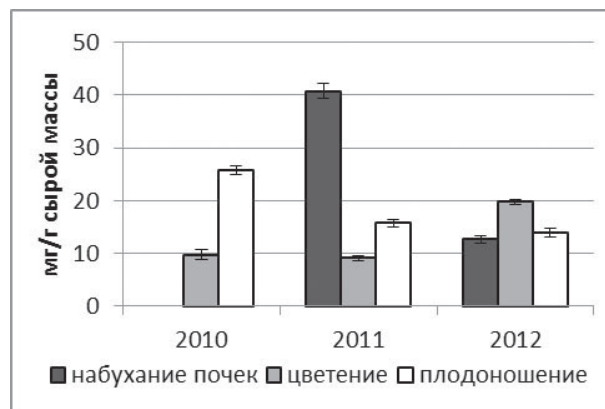


Рис. 2. Содержание катехинов в листьях клюквы крупноплодной в 2010–2012 гг.

В 2012 г. в период набухания почек исследуемых веществ синтезировалось меньше, чем в период плодоношения – 2011 г. (в 1,4–2,2 раза) и набухания почек – 2011 г. (в 2,6–4,2 раза). Особенно заметно снижение содержания флавоноидов, что вызвано, по-видимому, чуть более прохладными погодными условиями по сравнению с 2011 г. Интересно, что в 2012 г. максимальное за этот год количество СРФС и катехинов зарегистрировано в июне, тогда как в 2011 г. – наоборот.

Содержание СРФС и катехинов в микрорастениях и каллусах клюквы крупноплодной

Объект	Освещение	СРФС, мг/г сырой массы	Катехины, мг/г сырой массы
Микрорастения	Свет	44.24±1.57	9.37±0.76
Каллусы	НУК/Кин	Темнота	2.16±0.53
		Свет	1.44±0.33
	НУК/БАП	Темнота	2.60±0.22
		Свет	0.92±0.24
	2,4-Д/Кин	Темнота	0.99±0.07
Свет		0.13±0.04	

Сравнивая характер накопления вторичных метаболитов фенольной природы, стоит указать на снижение их содержания в листьях по мере взросления растений, о чем также сообщала Ж.А. Рупасова и др. [4] при исследовании клюквы крупноплодной в Белоруссии.

При выращивании клюквы в стерильных условиях происходит снижение содержания вторичных метаболитов по сравнению с открытым грунтом (табл.). Так, количество (мг/г сырой массы) СРФС снизилось до 65 (в 1,5–3,8 раза меньше, чем в интактных растениях в зависимости от года и фазы их вегетации); максимальные различия в содержании флавоноидов (данные не представлены) и катехинов составили 4,5 раза, однако в связи со снижением уровня этих веществ в листьях интактных растений (при их окончательном вступлении в генеративный период развития) различия между стерильными и интактными растениями могут нивелироваться.

Еще меньше фенолов синтезируется в каллусах (см. табл.). Количество СРФС и катехинов определяли после 1-го пассажа, но из-за невысокой скорости прироста биомассы не удалось взять на анализ культуры со сред с НУК/Кин (свет) и с 2,4-Д/БАП (свет, темнота). Для исследованных же культур было выявлено, что уровень СРФС в них ниже, чем в микрорастениях, в 17–44 раза, катехинов – в 3,5–72 раза. Пониженное образование вторичных соединений каллусами объясняется ослабленной дифференциацией и специализацией клеток [6]. Также нами показано, что на средах с 2,4-Д фенолов синтезируется меньше, чем на средах с НУК, и наблюдается тенденция к накоплению меньшего их количества на свету, чем в темноте. Ингибирую-

щее действие 2,4-Д на синтез вторичных веществ было показано на примере ряда других культур [7], а отсутствие стимулирующего действия света на биосинтетическую способность каллусных клеток объясняется тем, что они используют готовый органический углерод питательной среды.

Итак, нами было выявлено, что фенольный метаболизм клюквы крупноплодной (сорт «Ранний черный») зависит от природных условий, фенофазы и возраста растений. Накопление фенолов стимулируют, в частности, высокая температура и инсоляция. Растения в культуре *in vitro* сохраняют способность ко вторичному синтезу (в особенности к синтезу микрорастениями флавоноидных соединений). Несмотря на существенное снижение уровня полифенолов в каллусах, данные об их высоком накоплении интактными и стерильными растениями дают основание для дальнейших исследовательских работ по совершенствованию условий культивирования с целью получения биологически активных веществ фенольной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dai J., Mumper R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties // *Molecules*. 2010. V. 15, № 10. P. 7313–7352.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // *Биохимические методы в физиологии растений* / под ред. О.А. Павлиновой М.: Наука, 1971. С. 185–197.
3. Gunes G., Liu R.H., Watkins C.B. Controlled-atmosphere effects on postharvest quality and antioxidant activity of cranberry fruits // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50, №21. P. 5932–5938.

4. Рупасова Ж.А., Игнатенко В.А., Русаленко В.Г., Рудаковская Р.Н. Развитие и метаболизм клюквы крупноплодной в Белорусском Полесье. Мн.: Наука и техника, 1989. 205 с.

5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 271 с.

6. Загоскина Н.В., Запрометов М.Н. Влияние 1-нафтилуксусной кислоты на рост и образование

фенольных соединений в культуре ткани чайного растения // Физиология растений. 1979. Т. 20, вып. 4. С. 681–687.

7. Багратишвили Д.Г., Запрометов М.Н., Бутенко Р.Г. Образование фенольных соединений в суспензионной культуре клеток чайного растения и влияние на него уровня нитрата и гормональных эффекторов в питательной среде // Физиология растений. 1980. Т. 27, вып. 2. С. 696–702.



PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN *OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS. (CV. EARLY BLACK) CULTIVATED *IN VIVO* AND *IN VITRO*

© E.V. Berezina, A.A. Brilkina

An analysis was made on phenolic compounds content (sum of soluble phenolic compounds, flavonoids, catechins) in intact, sterile plants and calluses of the American cranberry cv. Early Black. It was found that flavonoid and catechin quantity in microplants compared well with their quantity in plants grown in the open; undifferentiated callus tissues accumulate much less phenolics than differentiated plant tissues *in vivo* and *in vitro*.

Key words: American cranberry, phenolics, flavonoids, catechins, *in vitro*, calluses.