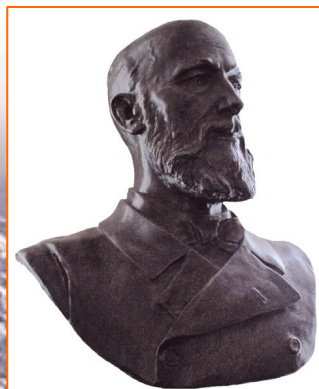
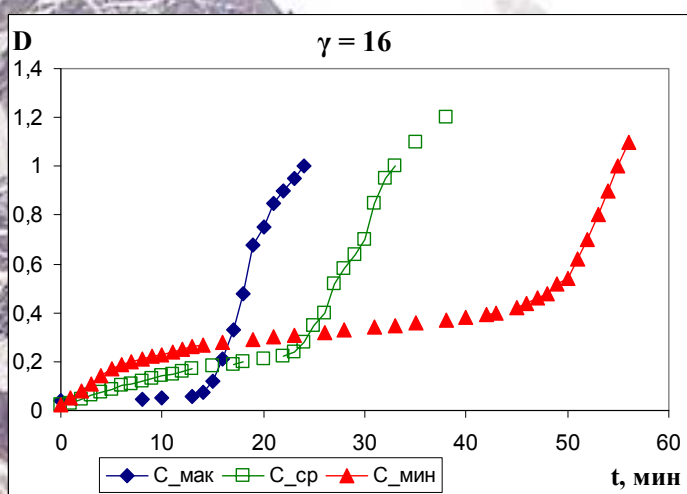


Бутлеровские сообщения

№12, том 26. 2011



ISSN 2074-0212



ISSN 2074-0948

International Edition in English:
Butlerov Communications



Изучение фенолкарбоновых кислот каллусных культур лекарственных растений семейства *araliaceae*

© Белых Юрий Вячеславович и Кириллова Надежда Васильевна*[†]

Кафедра биохимии. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия.

Ул. проф. Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 1977376. Россия

Тел.: (812) 234-90-33. Факс: 234-60-44. E-mail: kirillovanv47@mail.ru

*Ведущий направление; [†]Поддерживающий переписку

Ключевые слова: фенолкарбоновые кислоты, культура тканей лекарственных растений.

Аннотация

Показано, что биомассы каллусных культур тканей *Panax ginseng* женьшеня японского, *Panax quinquefolium* женьшеня американского, *Polyscias filicifolia* полисциас папоротниколистного содержат значительное количество фенолкарбоновых кислот. В частности, было установлено, что в исследуемых культурах тканей лекарственных растений присутствуют хлорогеновая, кофейная, ванилиновая, *n*-оксикоричная, феруловая, веротрановая и салициловая кислоты. В культивируемых клетках *Panax ginseng* салициловая кислота отсутствовала, а ее содержание в высушенных биомассах *Panax quinquefolium* и *Polyscias filicifolia* в несколько раз превышало содержание в них других фенол-карбоновых кислот.

Введение

Широкий интерес исследователей к фенолкарбоновым кислотам обусловлен их высокой биологической активностью [1]. В последние десятилетия появились работы, выполненные на культурах растительных тканей и микроорганизмах, которые свидетельствуют об особой роли фенолкарбоновых кислот. В частности, показано, что фенолкарбоновые кислоты, в том числе и салициловая кислота, участвуют в возникновении индуцированной устойчивости растений к патогенам и неблагоприятным условиям среды [2-7, 8].

Однако данные о качественном и количественном составе фенолкарбоновых кислот в культивируемых клетках, таких как биомасса ряда культур тканей семейства Аралиевые в литературе практически отсутствуют. В связи с этим в нашем исследовании была проведена сравнительная оценка содержания некоторых фенолкарбоновых кислот в клетках культур тканей женьшеня обыкновенного, женьшеня американского и полисциас.

Экспериментальная часть

Объектом работы служили культуры каллусных тканей растений *Polyscias filicifolia* полисциас, *Panax ginseng* женьшеня японского и *Panax quinquefolium* женьшеня американского. Культуры выращивали на стандартной агаризованной среде Мурасиге и Скуга, модифицированной Н.Ф. Писецкой [9] при температуре 26 ± 1 °C и относительной влажности воздуха 70% в темноте, с циклом культивирования 30-35 суток. После чего разрыхленную ткань весом около 5 г пересаживали на свежую питательную среду объемом 50 мл. Для проведения исследований использовали биомассу из 5-6 пассажей 20 суточного возраста.

Из сухой биомассы вышеуказанных культур получали вытяжки, содержащие сумму фенолкарбоновых кислот (ФКК) следующим образом: для удаления липофильных веществ навеску высушенной ткани обрабатывали хлороформом (1:3), полученный таким образом экстракт отбрасывали, шрот подвергали обработке этилацетатом в соотношении 1:5. Из полученного этилацетатного извлечения ФКК экстрагировали 3% водным раствором гидрокарбоната натрия. Полноту экстракции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии [1, 10].

Качественный анализ и оценка содержания некоторых ФКК проводилась методом ВЭЖХ на приборе «Миллхром 5.0» на колонке «Silasorb RP-18» размером 2×7.5 мм при температуре 35 °C, в системе ацетонитрил: 3% уксусная кислота в градиентном режиме, с использованием стандартных

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛЕКАРСТВЕННЫХ... 16-19 образцов. Расчет количеств ФКК проводился путем измерения площадей пиков с использованием калибровочного графика. В качестве маркеров для построения калибровочных кривых использовали хлорогеновую, ванилиновую, п-оксикоричную, феруловую, вератроновую и салициловую кислоты фирмы «Sigma».

Представленные в данной работе результаты обрабатывали статистически. Результаты выражали в средних значениях со стандартным отклонением (SD). Для оценки различий между экспериментальными данными использовали критерий – непарный *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне вероятности $p \leq 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что биомасса каллусных культур тканей женьшеня японского содержит 24, женьшеня американского – 16 и полисциас – 21 вещество, которые по максимумам поглощения в УФ-свете и временам удерживания на колонке можно отнести к ФКК.

Полученные данные, по-видимому, указывают на достаточно высокую активность фенилпропаноидного пути биосинтеза фенольных соединений в исследованных культивируемых растительных клетках (рис. 1-3). Из выявленных соединений было идентифицировано 4, 6 и 6 фенолкарбонновых кислот, соответственно, у женьшеня японского, женьшеня американского и полисциас.

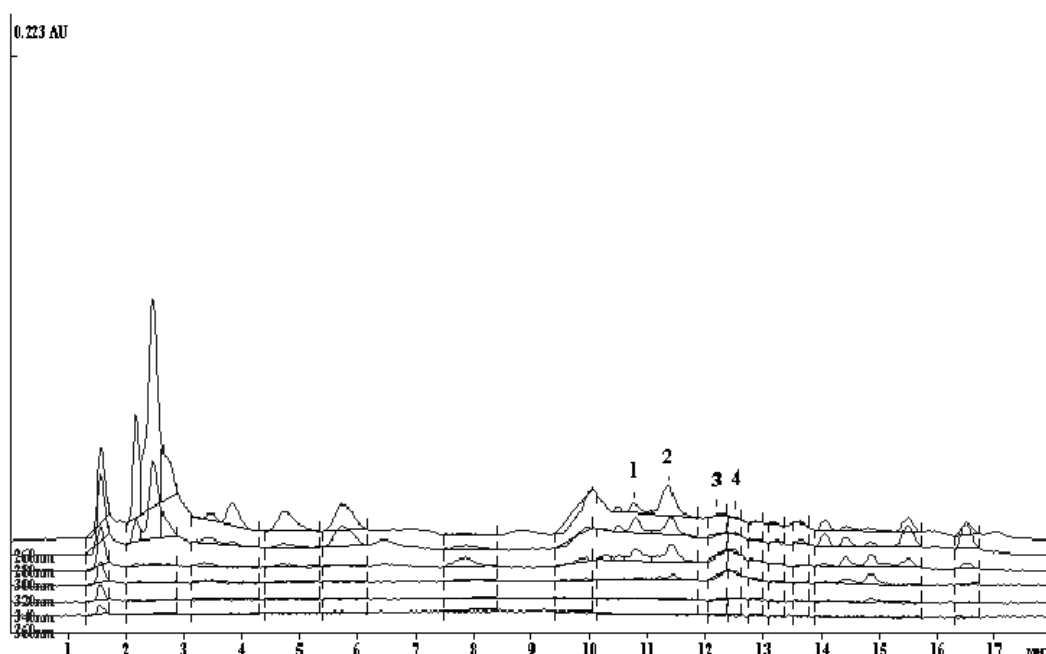


Рис. 1. Фенолкарбонновые кислоты растительных клеток культуры ткани *P. ginseng* (1 – хлорогеновая, 2 – ванилиновая, 3 – *p*-оксикоричная, 4 – вератровая кислоты)

Кроме того, в исследуемых культурах была идентифицирована коричная кислота – главный промежуточный метаболит биосинтеза оксикоричных кислот, относящихся к ФКК, соответственно $3 \times 10^{-5}\%$ в сухой биомассе женьшеня американского и женьшеня японского и $8 \times 10^{-5}\%$ в культуре ткани полисциас.

Установлено, что культура ткани женьшеня японского не накапливает салициловую кислоту, но содержит незначительное количество вератровой кислоты, присутствия которой в составе остальных исследованных культур отмечено не было.

Кроме того, было установлено, что культура ткани женьшеня японского отличается гораздо более низким содержанием идентифицированных в нашем исследовании фенолкарбонновых кислот в суховоздушной биомассе по сравнению с культурами тканей женьшеня американского и полисциас (таблица).

Как видно из таблицы, содержание салициловой кислоты в суховоздушной биомассе женьшеня американского и полисциас соответственно, составляет 0.0042% и 0.0023%, что в несколько раз превышает содержание в них других фенолкарбонновых кислот.

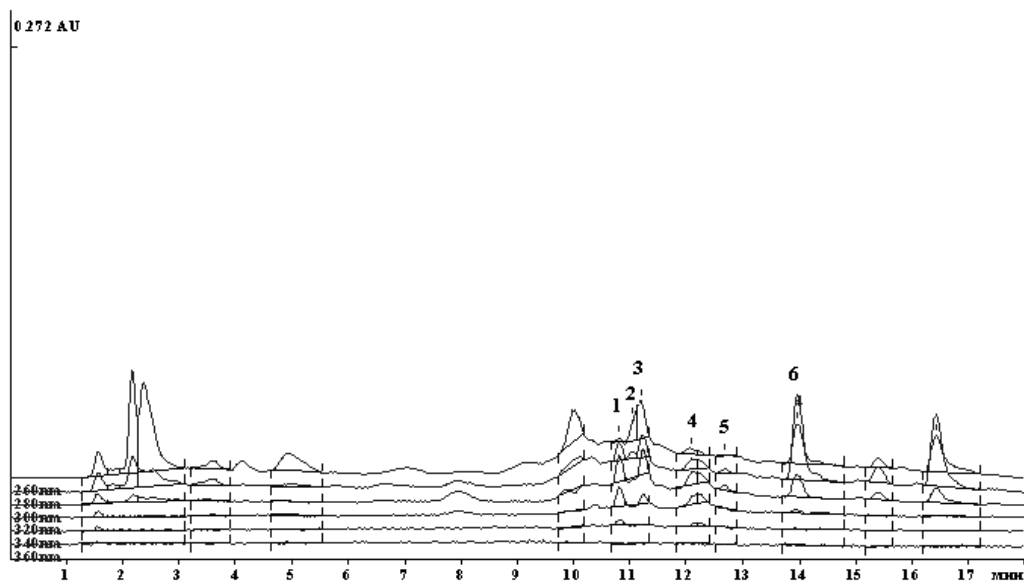


Рис. 2. Фенолкарбоновые кислоты растительных клеток культуры ткани *P. quinquefolium* (1 – хлорогеновая, 2 – кофейная, 3 – ванилиновая, 4 – *n*-оксикоричная, 5 – феруловая, 6 – салициловая кислоты)

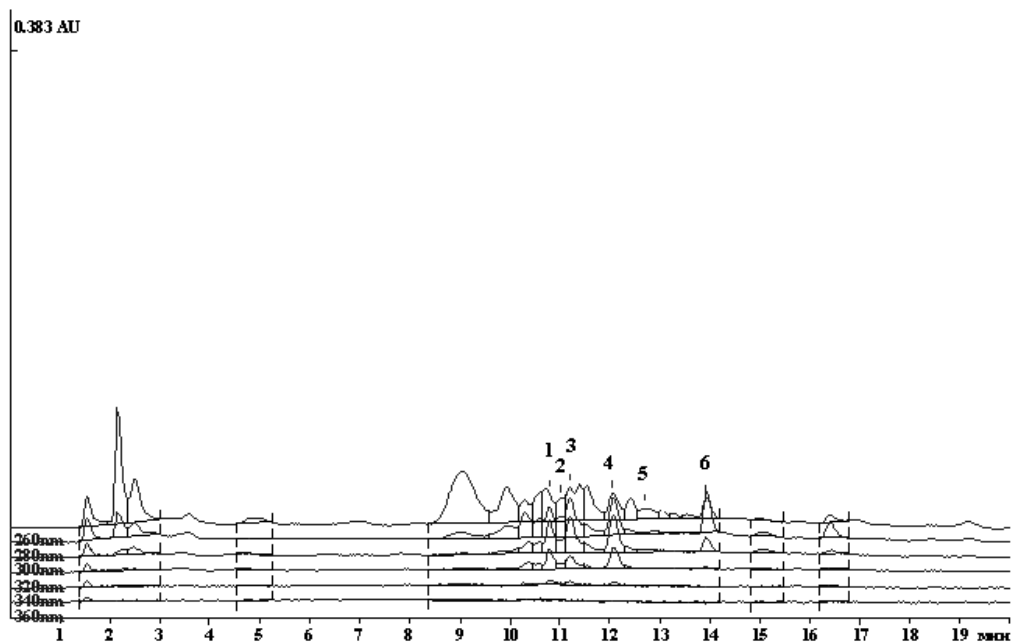


Рис. 3. Фенолкарбоновые кислоты растительных клеток культуры ткани *Polyscias filicifolia* (1 – хлорогеновая, 2 – кофейная, 3 – ванилиновая, 4 – *n*-оксикоричная, 5 – феруловая, 6 – салициловая кислоты)

Согласно полученным нами данным содержание салициловой кислоты в суховоздушной биомассе женьшеня американского почти в 2 раза превышает ее содержание в суховоздушной биомассе культуры ткани полисциас. Однако, содержание других ФКК, таких как хлорогеновая, кофейная, ванилиновая, *n*-оксикоричная и феруловая в суховоздушной биомассе культуры ткани полисциас более чем в 2-3 раза превышает их содержание в суховоздушной биомассе женьшеня американского (таблица).

Таблица. Содержание идентифицированных ФКК в культурах растительных клеток

ФКК, мкг в 100 гр сухой биомассы	Культура ткани		
	<i>Panax ginseng</i>	<i>Panax quinquefolium</i>	<i>Polyscias filicifolia</i>
хлорогеновая	130.00 ± 0.65	30.00 ± 0.36	705.00 ± 3.52
кофейная	-	145.50 ± 0.72	253.50 ± 1.27
ванилиновая	138.00 ± 0.80	128.50 ± 0.87	323.50 ± 1.62
<i>n</i> -оксикоричная	16.00 ± 0.24	51.00 ± 0.26	388.00 ± 1.94
феруловая	-	5.00 ± 0.06	270.00 ± 1.35
салициловая	-	4211.50 ± 21.06	2310.0 ± 11.55
вератровая	3.00 ± 0.06	-	-

Учитывая, что содержание коричной кислоты в суховоздушной биомассе женьшеня американского в 2.8 раза меньше, чем в суховоздушной биомассе клеток полисциас можно предположить, что, по-видимому, основным способом регуляции биосинтеза салициловой кислоты в каллусной культуре ткани женьшеня американского является ингибирование 4-гидроксилазы коричной кислоты [11].

Заключение

Таким образом, в данном исследовании была проведена сравнительная характеристика качественного и количественного состава некоторых фенолкарбонных кислот каллусных культур *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* и *Polyscias filicifolia*. В связи с тем, что функции ФКК и, в частности, СК в жизнедеятельности растений, как показывают полученные к настоящему времени данные литературы, индивидуальны и специфичны, поэтому продолжение работ в этом направлении может служить теоретической и практической основой для разработки систем адаптации растений к различным неблагоприятным факторам.

Выводы

При определении компонентного состава фенолкарбонных кислот биомассы каллусных культур двух видов женьшеня и полисциас, ранее не изученных, были идентифицированы хлорогеновая, кофейная, ванилиновая, *n*-оксикоричная, феруловая, салициловая и вератровая кислоты.

Литература

- [1] Запрометов М.Н. Образование и функции фенольных соединений в высших растениях. М. 1970. Т.31. №2.
- [2] Тарчевский И.А. Катаболизм и стресс у растений. М.: Наука. 1993. 80с.
- [3] Тарчевский И.А., Чернов В.М. Молекулярные аспекты фитоиммунитета. Микология и фитопатология. 2000. Т.34. №3. С.1-10.
- [4] Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука. 2002. 294с.
- [5] Z. Chen, D.F. Klessig. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in the signal transduction in the plant disease resistance response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol.88. No.18. P.8179-8183.
- [6] Z. Chen, H. Silva, D. Klessig. Oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Sciens. 1993. Vol.262. No.10. P.1883-1886.
- [7] Z. Chen, J. Malamy, J. Henning, U. Conrath, P. Sanchez-Cassas, H. Silva, J. Ricigliano, D.F. Klessig. Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1995. Vol. 92. No.24. P.4134-4137.
- [8] D.F. Klessig, J. Malamy. The salicylic acid signal in plants. Plant. Mol. Biol. 1994. Vol.26. No.5. P.1439-1458.
- [9] Писецкая Н.Ф. К вопросу о подборе питательной среды для культуры ткани женьшеня. Растительные ресурсы. 1970. Т.6. Вып.4. С.516-522.
- [10] Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. Учебн. пособие для биол. специальностей ун-тов. М.: «Высш. школа». 1974. 280с.
- [11] Guillaume A. Schoch, Georgi N. Nikov, William L. Alworth, Danie`le Werck-Reichhart. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. Plant Physiology. 2002. Vol.130. P.1022-1031.