На правах рукописи

003463458

КОСТИНА

Вера Михайловна

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ РОДА *RHODODENDRON* L. *IN VIVO* И *IN VITRO*

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

12 МАР 2009

Москва – 2009

***Работа выполнена в лаборатории липидного и фенольного метаболизма* Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, г. Москва.**

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Загоскина Наталья Викторовна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Озерецковская Ольга Леонидовна**

доктор биологических наук, профессор **Носов Александр Михайлович**

Ведущая организация:

Институт биологии Коми НЦ Уральского отделения РАН

Защита диссертации состоится «17» марта 2009 г. в 12 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35. Факс: (495)977-80-18, e-mail: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К. А. Тимирязва РАН.

Автореферат разослан 13 февраля 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук М. И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одними из наиболее распространенных в тканях высших растений вторичных метаболитов являются фенольные соединения. Они участвуют в основных процессах жизнедеятельности растительных клеток: фотосинтезе, дыхании, а также защите от действия стрессовых факторов биотического и абиотического происхождения (Запрометов, 1993, 1996). Благодаря высокой биологической активности полифенолы находят широкое практическое применение в медицине и фармакологии в качестве веществ, обладающих капилляроукрепляющим, нейрорегуляторным, биостатическим, иммуномоделирующим действием (Барабой, 1984; Куркин, 2003; Ramassamy, 2006; Weinreb et al., 2008; Antonio, Druse, 2008).

В последнее время большое внимание исследователей обращено на растения рода *Rhododendron* L., характеризующиеся высокой способностью к синтезу вторичных соединений, в том числе фенольной природы (Комисаренко и др., 1973; Дурмишидзе и др., 1981; Кемертелидзе и др., 2007). Сообщалось об образовании в них кверцетина, мирицетина, оксибензойной, оксикоричной и хлорогеновой кислот. Кроме того, в тканях рододендронов обнаружены редкие, специфичные продукты вторичного метаболизма, такие как дафнетоксин, таксифолин, родояпонин, маттеуцинол, азалеин, успешно используемые в терапии нейродегеративных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний (Белоусов, 1995; Кемертелидзе, 2007; Chosson et. al., 1998; Willcox et al., 2004; Prakash et al., 2007).

Синтез вторичных веществ, в том числе фенольной природы, сохраняется и при культивировании клеток и тканей растений в условиях *in vitro* (Zaprometov, 1989; Носов, 1991). В литературе сообщалось о способности клеточных и тканевых культур рододендронов к образованию терпеноидов и алкалоидов (Asti, 2000; Noo et al., 2002), тогда как сведения об их фенольном метаболизме практически отсутствуют.

Цели и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей фенольного метаболизма растений рода *Rhododendron* L., а также инициированных из них каллусных культур и растений-регенерантов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить особенности образования фенольных соединений в листьях и стеблях однолетних побегов рододендронов.

2. Выяснить локализацию фенольных соединений в различных органах рододендронов и ее изменение в процессе вегетации.
3. Получить каллусные культуры рододендронов и изучить особенности образования и локализации в них фенольных соединений.
4. Исследовать образование и локализацию фенольных соединений в растениях-регенерантах рододендронов, культивируемых в условиях *in vitro*.
5. Изучить состав фенольных соединений рододендронов и инициированных из них растений-регенерантов.

Научная новизна. Впервые проведено исследование фенольного метаболизма вечнозеленого, полувечнозеленого и листопадного рододендронов, устойчивых к климату большинства районов умеренной зоны России, а также инициированных из них каллусных тканей и растений-регенерантов.

Показано, что вечнозеленый рододендрон Смирнова (*Rh. smirnowii)* обладает более высокой способностью к синтезу полифенолов, чем полувечнозеленый рододендрон Ледебура (*Rh. ledebourii)* и листопадный рододендрон японский (*Rh. japonicum)*. Выявлены особенности образования фенольных соединений в листьях и стеблях однолетних побегов рододендронов на различных этапах их вегетации.

Выяснено, что введение тканей рододендронов в культуру *in vitro* сопровождается значительным снижением их способности к синтезу фенольных соединений. В тоже время уровень накопления этих вторичных метаболитов может влиять на жизнеспособность каллусных культур.

Установлено, что повышение уровня дифференциации клеток сопровождается увеличением их способности к образованию полифенолов. Так, в микропобегах растений-регенерантов, находящихся в стадии устойчивой пролиферации, содержание фенольных соединений было значительно выше, чем в каллусных тканях. В процессе культивирования уровень их накопления увеличивался, достигая такового интактного растения.

Установлено, что активность *L*-фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ) – ключевого фермента биосинтеза полифенолов, не определяет уровень накопления фенольных соединений в тканях интактных растений, тогда как в условиях *in vitro* она может служить критерием оценки биосинтетической способности каллусных культур и растений-регенерантов.

Выяснено, что внутриклеточная локализация растворимых фенольных соединений отмечается в эпибластах, либо приурочена к изолированным компартментам клеток (клеточная стенка, центральная вакуоль или микровакуоли). В тканях интактных растений и инициированных из них растений-регенерантов фенольные соединения были обнаружены, преимущественно, в эпидерме, зоне проводящих пучков, а также в специализированных секреторных структурах протодермального происхождения, таких как железистые и бахромчатые волоски, трихомы, железки.

Установлено, что основными компонентами фенольного комплекса листьев однолетних побегов рододендронов являются флавоноиды (главным образом, флавонол-гликозиды), а также моно-, ди- и тримеры проантоцианидинов. В условиях *in vitro* доля флавоноидов в фенольном комплексе растений-регенерантов снижается на фоне увеличения уровня фенилпропаноидов. Кроме того, в них образуются редкие, специфичные компоненты фенольной природы, имеющие ограниченное распространение в тканях высших растений.

Научно-практическое значение. Полученные данные вносят значительный вклад в выяснение особенностей фенольного метаболизма растений рода *Rhododendron* L. Сведения о содержании различных соединений фенольной природы могут быть использованы для оценки фармакологической ценности растительного сырья. Изучение биосинтетической способности каллусных культур и растений-регенерантов позволяет судить о широком спектре участия фенольных соединений в жизнедеятельности растительных клеток.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на VI симпозиуме по фенольным соединениям (Москва, 2004), VI и VII Международных симпозиумах «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пущино, 2005; Мичуринск, 2008), VI съезде Общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), годичном собрании Общества физиологов растений России и Международной научной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), а также на расширенном семинаре лаборатории липидного и фенольного метаболизма ИФР РАН (Москва, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 2 статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста и содержит 6 таблиц и 42 рисунка. Список литературы включает 172 источников, 100 из которых на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили однолетние побеги вечнозеленого рододендрона Смирнова (*Rh. smirnowii* Trautv.), полувечнозеленого рододендрона Ледебура (*Rh. ledebourii* Pojark.) и листопадного рододендрона японского (*Rh. japonicum* (Grey) Suring.), а также инициированные из них каллусные культуры и растения-регенеранты.

Каллусные культуры были инициированы из листьев однолетних побегов рододендронов и 50-дневных стерильных проростков. Культивирование тканей проводили в темноте при 26°С на модифицированной питательной среде Андерсона, содержащей 2,4-Д (5мг/л), изопентиладенин (5мг/л), сахарозу (30 г/л) и агар (8 г/л) (Anderson, 1984, 1985). Продолжительность пассажа составляла 30-35 суток.

Растения-регенеранты были получены из листовых почек интактных растений путем прямого морфогенеза (Anderson, 1985; Васильева, Александрова, 2005). Культивирование проводили на модифицированной питательной среде Андерсона при 21-23°С и относительной влажности воздуха 70%.

Определение содержания фенольных соединений проводили в 96%-ных этанольных экстрактах спектрофотометрическим методом. Суммарное содержание фенольных соединений, флавонолов, флаванов и проантоцианидинов определяли с реактивом Фолина-Дениса (поглощение при 725 нм), 0,5%-ным водным раствором $AlCl_3$ (при 415 нм), 1%-ным раствором ванилина в 70%-ной H_2SO_4 (при 500 нм) и бутанольным реактивом (при 550 нм) соответственно (Запрометов, 1971, 1974; Gage, Wendei, 1950). Калибровочные кривые строили по (-)-эпикатехину (для суммы растворимых фенольных соединений и флаванов) и по рутину (для фловонолов).

Определение активности *L*-фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ). Для выделения фермента использовали Na-боратный буфер (pH 8,8), содержащей ЭДТА (0,5 мМ), дитиотреитол (3 мМ) и поливинилпирролидон (Шипилова, Запрометов, 1977). Активность ФАЛ определяли в надосадочной жидкости после центрифугирования гомогената при 14000 об./мин (Zucker, 1965). Спектрофотометрическое определение образования *транс*-коричной кислоты из *L*-фенилаланина проводили при 290 нм после предварительного инкубирования реакционной смеси в течение 60 мин при 37°С.

Содержание белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Определение тканевой и внутриклеточной локализации фенольных соединений проводили на свежих срезах тканей интактных растений, растений-регенерантов (25 мкм), а также на давленых препаратах каллусных культур. Для выяснения локализации фенольных соединений использовали реактив «Fast Blue» (Soukupova, 2000), а для флаванов - ванилиновый реактив (Приступа, 1970). Препараты просматривали с помощью светового микроскопа Ergavall («Karl Ziess», Германия).

Определение состава фенольных соединений методом ВЭЖХ. Фенольные соединения извлекали из измельченного растительного материала охлажденной смесью хлороформ/метанол/вода (3/5/2). Экстракты анализировали с помощью хроматографической системы HPLC-DAD (Merck-Hitachi, Япония), включающей насос L-7100, диодный детектор L-7455, колонку Chromolith Performance RP-18 (100 x 4,6 мм; Merck, Германия). В качестве растворителей использовали 0,2%-ный водный раствор муравьиной кислоты (А) и 2%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Профиль элюции: 0-2 мин, 2 % Б в А; 2-16 мин, 2-20 % Б в А (линейный градиент); 16-20 мин, 20-30 % Б в А (линейный градиент); 20-22 мин, 30-70 % Б в А (линейный градиент); 22-26 мин, 70 % Б.

ВЭЖХ-масс-спектрофотометрический анализ образцов был проведен с помощью системы HPLC-ESI-MS, используя аналогичный профиль элюции (Salminen et al., 1999).

Идентификация индивидуальных фенольных соединений проводилась на основе их УФ- и масс- спектров.

Статистическая обработка результатов. Исследования проводили в трех биологических и 2-3 аналитических повторностях. Все результаты обработаны статистически. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование и локализация фенольных соединений в растениях рода *Rhododendron* L.

Первостепенной задачей являлось изучение особенностей образования фенольных соединений в вегетативных органах рододендронов на различных этапах вегетации.

Содержание фенольных соединений. Определение суммарного содержания фенольных соединений показало, что в листьях однолетних побегов оно было выше, чем в стеблях (рис.1*а*). Исключением являлся полувечнозеленый *Rh. ledebourii*, у которого уровень этих веществ был практически одинаков.

В процессе вегетации отмечались значительные изменения в накоплении полифенолов. В листьях наибольшее их содержание отмечалось летом, к осени оно незначительно снижалось, а зимой вновь возрастало. В стеблях, как правило, уровень этих веществ почти не менялся, за исключением вечнозеленого *Rh. smirnowii*, у которого он постепенно увеличивался, достигая максимальных значений зимой (в период покоя).

Известно, что одними из наиболее распространенных компонентов фенольного комплекса надземных органов высших растений являются флавонолы. В листьях однолетних побегов рододендронов уровень их накопления был значительно выше, чем в стеблях (рис. 1*б*). По мере вегетации содержание флавонолов в листьях значительно увеличивалось, особенно у листопадного *Rh. japonicum* и полувечнозеленого *Rh. ledebourii*.

Рядом авторов сообщалось о высокой способности рододендронов к синтезу флаванов – веществ, обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью (Запрометов, 1964; Harborn 1989, Дурмишидзе и др., 1981). В листьях однолетних побегов их содержание было выше по сравнению со стеблями (рис. 1*в*).

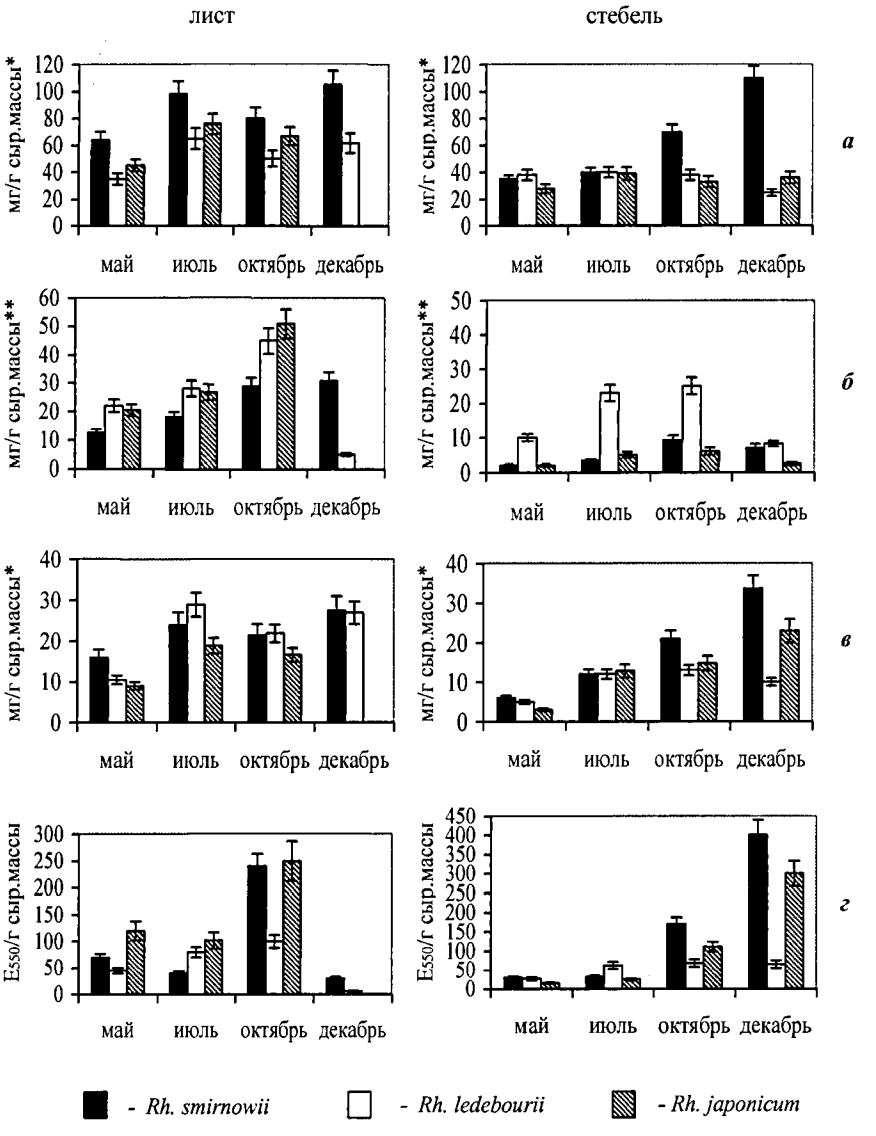

Рис. 1. Содержание суммы растворимых фенольных соединений (*а*), флавонолов (*б*), флаванов (*в*) и проантоцианидинов (*г*) в листьях и стеблях однолетних побегов рододендронов.

* - в эквивалентах эпикатехина; ** - в эквивалентах рутина

При этом наибольшее накопление флаванов в листьях отмечалось летом, осенью оно незначительно снижалось, а зимой – вновь возрастало. В стеблях в большинстве случаев максимальный их уровень наблюдался на завершающих этапах периода вегетации, особенно у вечнозеленого *Rh. smirnowii.*

Накопление полимерных форм флаванов – проантоцианидинов, было значительно выше в листьях по сравнению со стеблями за исключением периода покоя (рис. 1*г*). Зимой (декабрь) наибольшее их содержание отмечалось в стеблях, что согласуется с динамикой суммарного накопления флаванов.

Следует также отметить, что в листьях *Rh. smirnowii* и *Rh. japonicum* практически на всех этапах роста на долю флаванов приходилось около 25% от суммарного содержания полифенолов, тогда как у *Rh. ledebourii*, она была существенно выше. В стеблях, в большинстве случаев, доля флаванов составляла около 30%, за исключением листопадного *Rh. japonicum*, у которого зимой она достигала 45%.

Активность L-фенилаланинаммиак-лиазы. Одним из ключевых ферментов биосинтеза фенольных соединений является – *L*-фенилаланинаммиак-лиаза (ФАЛ), катализирующая дезаминирование *L*-фенилаланина с образованием *транс*-коричной кислоты.

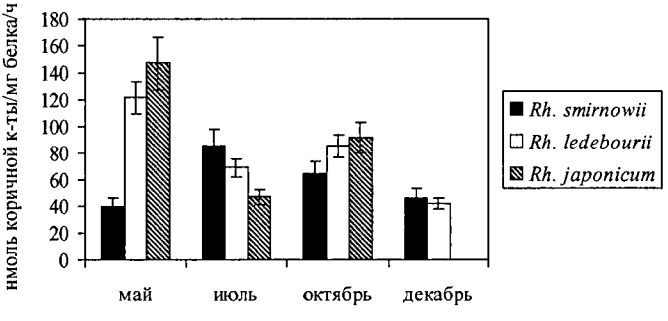

Рис. 2. Активность ФАЛ в листьях однолетних побегов рододендронов на различных этапах вегетации.

Как следует из приведенных на рис. 2 данных, изменения активности ФАЛ в тканях *Rh. japonicum* и *Rh. ledebourii* на протяжении всего периода вегетации носили схожий характер: ее максимальный уровень наблюдался весной, летом он резко снижался, а осенью вновь возрастал. У вечнозеленого *Rh. smirnowii* наибольшая активность ФАЛ отмечалась летом, в период активного роста и развития растений. Все это свидетельствуют об отсутствии четкой взаимосвязи между активностью фермента и уровнем накопления полифенолов.

Локализация фенольных соединений. Важным аспектом исследования являлось не только изучение уровня накопления полифенолов в растительных тканях, но и особенностей их компартментации. Гистохимические исследования листьев однолетних побегов рододендронов, взятых на различных этапах вегетации (лето, зима) показали, что фенольные соединения накапливались в клетках эпидермы, столбчатого мезофилла и губчатой паренхимы воздухоносных тканей (рис. 3*а*, *б*). Кроме того, полифенолы, преимущественно флавановой природы, были обнаружены в области проводящих пучков, а также в клетках, формирующих смоляные ходы и масляные протоки (рис. 3 *г*, *д*). Значительное накопление фенольных соединений отмечалось также в специализированных секреторных структурах протодермального происхождения, таких как железистые и бахромчатые волоски, трихомы и железки, но только в молодых, активно растущих тканях (рис. 3 *а*, *в*).

В однолетних неодревесневших стеблях фенольные соединения локализовались в одноклеточных сосковидных волосках, эпидерме, механических тканях (склеренхиме), а также в элементах флоэмы и ксилемы (рис. 3 *ж*). К периоду покоя (зимой) их значительное накопление отмечалось во всех тканях стебля, включая сердцевину (рис. 3 *ж-и*). При этом фенольные соединения не были обнаружены в одноклеточных сосковидных волосках (рис. 3 *е*). В целом, полученные данные свидетельствуют об увеличении накопления фенольных соединений в стеблях зимой, особенно у вечнозеленого *Rh. smirnowii,* что согласуется с данными биохимических исследований.

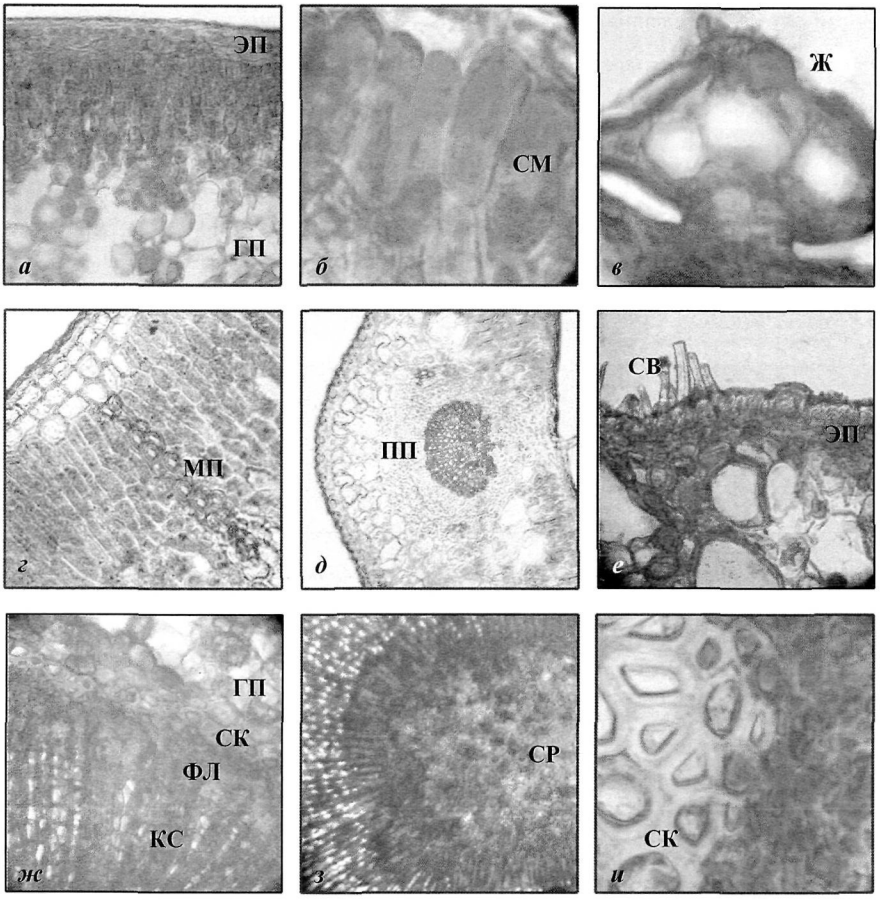

Рис. 3. Локализация фенольных соединений в листьях (*а-д*) и стеблях (*е-и*) однолетних побегов рододендронов (*а-в, е-и* – окрашивание реактивом «Fast blue»; *г, д* – ванилиновый реактив). Увеличение: 3,2х16 (*а, д, е- з*), 7х20 (*б-г, и*).

ЭП – эпидерма, СМ – столбчатый мезофилл, ГП – губчатая паренхима, ПП – проводящий пучок, МП – масляный проток, СВ – сосковидные волоски, ФЛ – флоэма, КС – ксилема, СР – сердцевина, СК – склеренхима, Ж - железка.

Каллусные культуры рододендронов и образование в них фенольных соединений

В литературе не раз сообщалось о сложностях введения рододендронов в культуру *in vitro*, связанных с низкой скоростью роста и жизнеспособностью полученных тканей.

Инициированные из *Rh. japonicum* и *Rh. ledebourii* каллусы значительно отличались по морфологическим характеристикам. Культуры *Rh. ledebourii* представляли собой медленно растущие рыхлые, оводненные ткани кремово-желтого цвета. Каллусы *Rh. japonicum* были более плотными, компактными, светло-кремового цвета с густым белым опушением.

Содержание фенольных соединений. Каллусные культуры рододендронов обладали значительно более низкой способностью к синтезу полифенолов по сравнению с исходными эксплантами (рис. 1, 4). При этом содержание фенольных

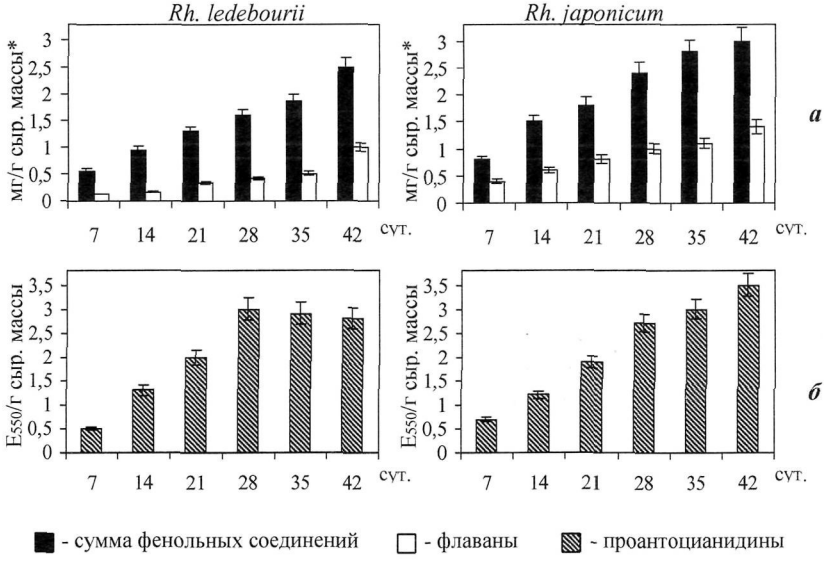

Рис. 4. Динамика накопления суммы растворимых фенольных соединений и флаванов (*а*), а также проантоцианидинов (*б*) в каллусных культурах рододендронов в течение пассажа.

* - в эквивалентах эпикатехина

соединений, в том числе флаванов, увеличивалось в течение пассажа (рис. 4 *а*). Существенные различия в фенольном метаболизме исследуемых культур были обнаружены лишь на уровне накопления полимерных форм флаванов – проантоцианидинов. В обоих случаях их уровень возрастал до середины пассажа, а затем либо продолжал увеличиваться (в каллусе *Rh. japonicum*), либо незначительно снижался (в каллусе *Rh. ledebourii)* (рис. 4 *б*). Таким образом, наибольшая биосинтетическая способность отмечалась в стационарную фазу роста каллусных тканей рододендронов.

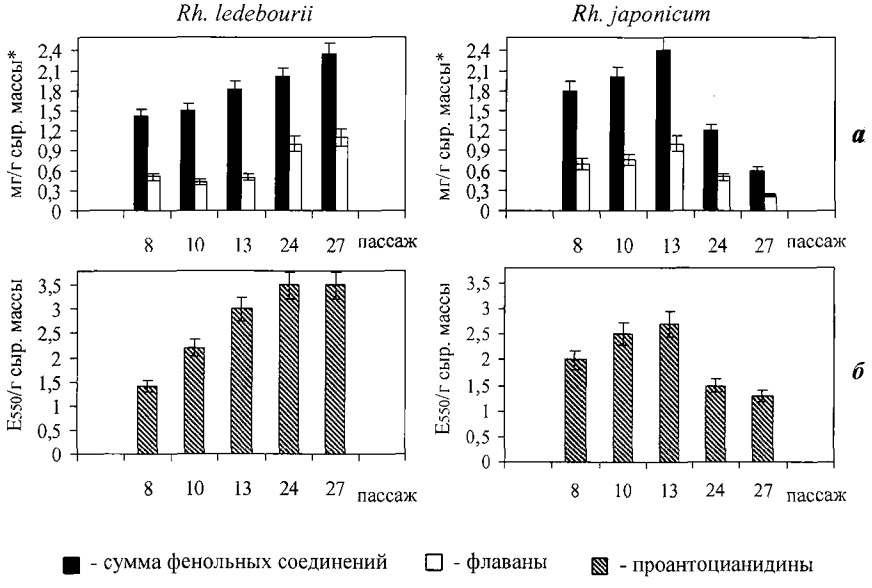

Рис. 5. Содержание суммы растворимых фенольных соединений и флаванов (*а*), а также проантоцианидинов (*б*) в каллусных культурах рододендронов при длительном культивировании.

* - в эквивалентах эпикатехина

При длительном культивировании суммарное содержание полифенолов, в том числе флаванов, в каллусных тканях постепенно увеличивалось вплоть до 13 пассажа (рис. 5 *а*). Последующее культивирование тканей *Rh. ledebourii* сопровождалось повышением уровня накопления этих веществ, угнетением роста и гибелью

каллусов, тогда как биосинтетическая способность культуры *Rh. japonicum* постепенно снижалась, что позволяло ей длительное время сохранять жизнеспособность. Аналогичная тенденция отмечалась и в динамике накопления проантоцианидинов (рис. 5 *б*).

Активность L-фенилаланинаммиак-лиазы. В каллусных культурах рододендронов активность ФАЛ была ниже, чем в тканях интактных растений (рис. 6). При этом на начальных этапах культивирования (13 пассаж) в каллусах *Rh. japonicum* она была значительно выше, чем в каллусах *Rh. ledebourii.* При дальнейшем культивировании у *Rh. ledebourii* активность ФАЛ существенно увеличивалась и была в 3 раза выше, чем у культуры *Rh. japonicum.* Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимосвязи между активностью ФАЛ и уровнем накопления фенольных соединений.

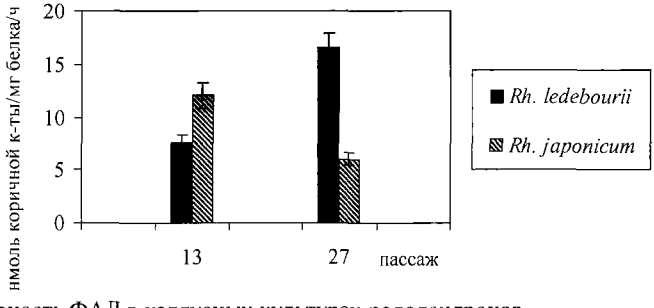

Рис. 6. Активность ФАЛ в каллусных культурах рододендронов.

Локализация фенольных соединений. Исследование внутриклеточной локализации полифенолов в каллусных культурах рододендронов показало, что у *Rh. ledebourii* они накапливались преимущественно в вакуолях и микровакуолях, а также в виде аморфных или гранулированных включений в цитозоле, тогда как у *Rh. japonicum* – в клеточных стенках и межклетниках (рис. 7). Кроме того, в обоих случаях наблюдалось формирование специализированных клеток-вместилищ, расположенных одиночно или небольшими группами среди основной массы паренхимных клеток, а также в области меристематических очагов. В процессе культивирования у *Rh. ledebourii* число клеток-вместилищ постепенно увеличивалось, тогда как у *Rh. japonicum* к 20 пассажу их образование было единичным, а фенольные соединения накапливались, преимущественно в утолщенных клеточных стенках.

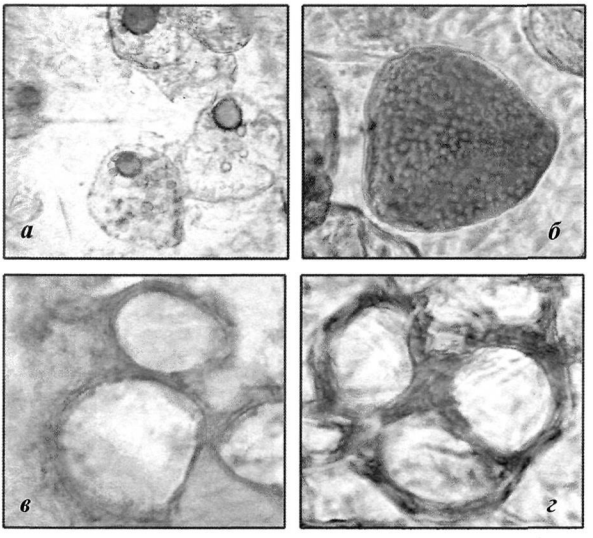

Рис. 7. Локализация фенольных соединений в каллусных культурах *Rh. ledebourii* (*а, б*) и *Rh. japonicum* (*в, г*). Увеличение: 3,2х16 (*а*), 7х20 (*б-г*).
а, в – 10 пассаж; *б, г* – 20 пассаж

Образование и локализация фенольных соединений в растениях-регенерантах рододендронов

Известно, что способность к синтезу полифенолов во многом зависит от уровня дифференциации культивируемых клеток и тканей. В связи с этим на следующем этапе работы в качестве объектов исследования были использованы растения-регенеранты, полученные методом клонального микроразмножения рододендронов и культивируемые в условиях *in vitro*.

Содержание фенольных соединений. Как следует из представленных на рис. 8 данных, уровень накопления фенольных соединений в микропобегах был значительно выше по сравнению с каллусами и на 25-30% ниже, чем в исходных эксплантах (см. рис. 1). При этом растения-регенеранты сохраняли способность к образованию всех основных компонентов фенольной природы, характерных для интактных растений.

В микропобегах рододендронов первого года культивирования существенных различий в накоплении фенольных соединений не отмечалось. По мере их дальнейшего роста (к 24 мес.) содержание полифенолов увеличивалось, что может быть следствием изменения уровня дифференциации и более эффективным развитием

растительных клеток и тканей. Следует также отметить, что микропобеги *Rh. japonicum* обладали наибольшей способностью к синтезу проантоцианидинов, что было характерно и для тканей интактного растения.

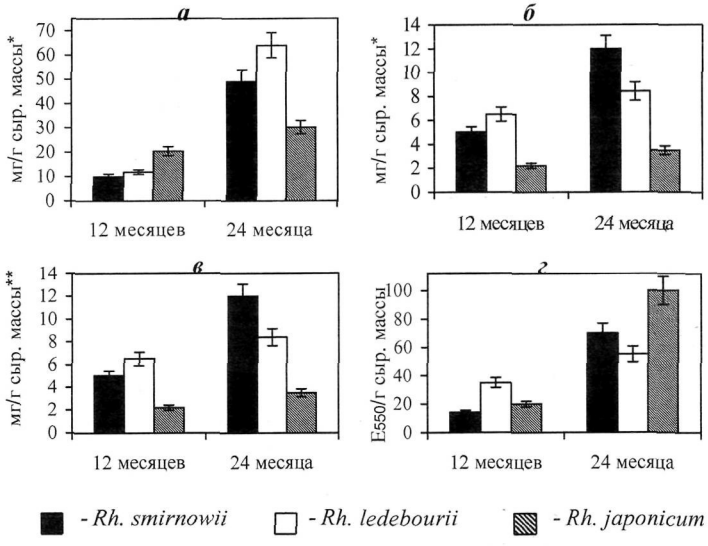

Рис. 8. Содержание суммы растворимых фенольных соединений (*а*), флаванов (*б*), флавонолов (*в*) и проантоцианидинов (*г*) в микропобегах рододендронов.

* - в эквивалентах эпикатехина; ** - в эквивалентах рутина

<u>Активность L-фенилаланинаммиак-лиазы.</u> Изучение активности фермента показало, что в микропобегах первого года культивирования она была практически одинаковой (рис. 9).

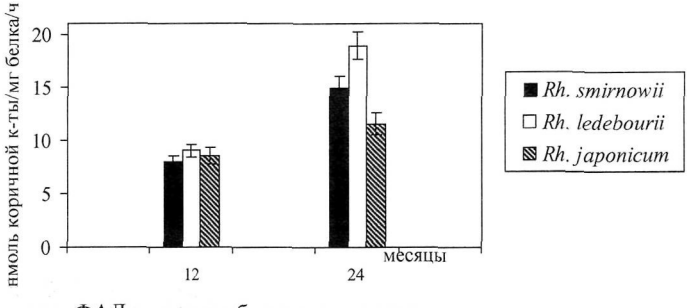

Рис. 9. Активность ФАЛ в микропобегах рододендронов.

По мере роста (к 24 мес.) активность ФАЛ увеличивалась, особенно в микропобегах *Rh. ledebourii*. Таким образом, в тканях растений-регенерантов, как и в каллусных культурах, активность фермента обуславливает уровень накопления полифенолов и может служить критерием оценки их биосинтетической способности.

Локализация фенольных соединений. В листьях микропобегов полифенолы накапливались, преимущественно, в клеточных стенках и содержимом клеток эпидермы, а также в области проводящих пучков (рис. 10 *в*, *е*). Кроме того, они были обнаружены в пельтатных железках (у *Rh. ledebourii*), железистых и бахромчатых волосках (у *Rh. japonicum*) (рис. 10 *а*, *б*, *г*, *д*). Следовательно, характер их распределения в большинстве случаев соответствовал таковому в тканях интактных растений.

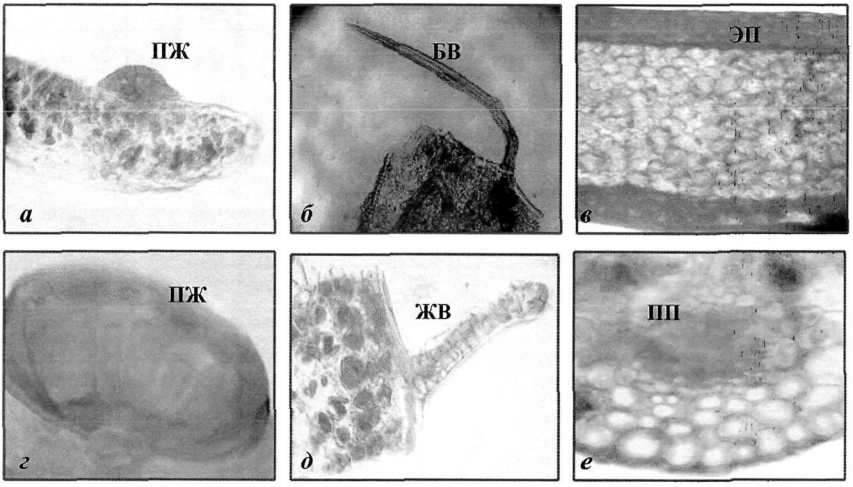

Рис. 10. Локализация фенольных соединений в микропобегах рододенронов. Увеличение: 3,2х16 (*а-в*, *д*, *е*), 7х20 (*г*).

ПЖ – пельтатная железка, БВ – бахромчатый волосок, ЖВ – железистый волосок, ЭП – эпидерма, ПП – проводящий пучок.

Состав фенольного комплекса рододендронов *in vivo* и *in vitro*

Поскольку состав фенольного комплекса рододендронов исследован крайне мало, следующей нашей задачей являлось изучение его индивидуальных компонентов.

Состав фенольного комплекса листьев рододендронов. Данные, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии свидетельствуют о значительном разнообразии фенольного комплекса рододендронов.

В водорастворимой полярной фракции листьев однолетних побегов рододендронов, собранных в летний период вегетации, было обнаружено более 60 индивидуальных веществ фенольной природы, подавляющее большинство из которых являлись флавоноидами. При этом, у *Rh. smirnowii* их доля в суммарном содержании полифенолов составляла около 50%, тогда как у *Rh. japonicum* и *Rh. ledebourii* 70 и 80% соответственно. Межвидовые различия проявлялись, главным образом, на уровне основных компонентов фенольной природы. Так, в листьях вечнозеленого *Rh. smirnowii* они были представлены, преимущественно, производными кверцетина (авикулярин, кверцетин-3-рамнопиранозид, кверцетин-3-О-галактопиранозид), а также оксикоричной и неохлорогеновой кислотами. У *Rh. japonicum* были обнаружены апигенин-7-О-неогесперидозид и хлорогеновая кислота, а у *Rh. ledebourii* – гликозиды кверцетина и мирицетина, а также неохлорогеновая и кумарилхинная кислоты. Кроме того, множество компонентов фенольного комплекса рододендронов были представлены моно-, ди- и тримерами проантоцианидинов.

Наряду с типичными соединениями фенольной природы, были обнаружены редкие, видоспецифичные вещества, имеющие ограниченное распространение в тканях высших растений и обладающие высокой биологической активностью. Например, в листьях *Rh. smirnowii* были обнаружены дафнетоксин (*орто*-бензойная кислота), таксифолин, а также ряд специфических флавонов (2-метил-7-аллилокси-2',4'-диметокси-изофлавон и 3,5,7-триметокси-флавон).

Состав фенольного комплекса растений-регенерантов рододендронов. Состав фенольного комплекса растений-регенерантов значительно отличался от такового интактных растений. В большинстве случаев он был менее разнообразным, за счет снижения доли флавоноидов и увеличения – фенилпропаноидов. Наименьшей

способностью к синтезу флавоноидов обладали микропобеги *Rh. japonicum* и *Rh. ledebourii* второго года культивирования (25-30% от суммарного содержания полифенолов), а наибольшей – *Rh. smirnowii* (43%), что было на уровне интактного растения.

Следует также отметить, что в микропобегах рододендронов был обнаружен ряд нехарактерных для интактных растений соединений. Например, в тканях *Rh. smirnowii* был обнаружен акацетин-7-О-рутинозид, а у *Rh. ledebourii* – специфический 1,4-*бис*-(4-бромофенокси)-антрахинон. Кроме того, в обоих случаях отмечалось образование трилейкофисетинидина – проантоцианидина, не обнаруженного в тканях интактных растений.

ВЫВОДЫ

1. Рододендроны относятся к фенолнакапливающим растениям, у которых в большинстве случаев содержание полифенолов выше в листьях однолетних побегов по сравнению со стеблями.
2. Характер накопления фенольных соединений в тканях однолетних побегов рододендронов меняется по мере вегетации. Период активного роста и развития растений характеризуется высоким уровнем фенилпропаноидов и мономерных форм флаванов, тогда как завершающие этапы – накоплением флавонолов и проантоцианидинов.
3. Введение тканей рододендронов в культуру *in vitro* сопровождается значительным снижением способности каллусных культур к синтезу полифенолов, а уровень их накопления может определять жизнеспособность клеток.
4. Растения-регенеранты, полученные методом клонального микроразмножения и культивируемые в условиях *in vitro*, сохраняют достаточно высокую способность к синтезу полифенолов, постепенно увеличивающуюся в процессе культивирования.
5. В тканях интактных растений не отмечается взаимосвязь между активностью *L*-фенилаланинаммиак-лиазы и уровнем накопления фенольных соединений, тогда как в каллусных культурах и растениях-регенерантах она может служить критерием оценки их биосинтетической способности.

6. В тканях рододендронов и инициированных из них растений-регенерантов локализация фенольных соединений отмечается, преимущественно, в эпидерме, зоне проводящих пучков, а также в специализированных секреторных структурах протодермального происхождения, таких как железистые и бахромчатые волоски, трихомы, железки.
7. Доминирующими компонентами фенольного комплекса листьев однолетних побегов рододендронов являются флавоноиды, представленные, главным образом, флавонол-гликозидами, а также моно-, ди- и тримерами проантоцианидинов. Введение в культуру *in vitro* сопровождается снижением доли флавоноидов в фенольном комплексе растений-регенерантов на фоне увеличения уровня фенилпропаноидов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Костина В. М.**, Загоскина Н. В. Способность растений рода *Rhododendron* к образованию фенольных соединений // Тезисы докладов VI симпозиума по фенольным соединениям. Москва. 2004. С. 45-46
2. **Костина В. М.**, Васильева О. Г., Молканова О. И., Загоскина Н. В. Об образовании фенольных соединений в растениях рода *Rhododendron* // Тезисы докладов VI Международного симпозиума «Новые нетрадиционные растения и перспективы их использования». Москва – Пущино. 2005. Т. 3. С. 30-32
3. **Костина В. М.**, Васильева О. Г., Александрова М. С., Загоскина Н. В. Накопление фенольных соединений в растениях рода *Rhododendron* // Бюллетень ГБС РАН. 2005. Вып. 191. С. 168-179
4. Васильева О. Г, **Костина В. М.**, Александрова М. С., Загоскина Н. В. Микроклональное размножение рододендронов и исследование их метаболизма на уровне накопления фенольных соединений // Тезисы докладов Международного научно-практического семинара «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. 2006. С. 63-65.
5. **Костина В. М.**, Загоскина Н. В. Каллусные культуры рододендрона Ледебура и образование в них фенольных соединений // Тезисы докладов Международного

научно-практического семинара «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. 2006. С. 152-154.

6. **Костина В. М.**, Загоскина Н. В. Растения рода *Rhododendron* и накопление в них флаванов // Тезисы докладов региональной конференции физиологов растений. Орел. 2006. С. 117-118
7. **Костина В. М.**, Васильева О. Г., Загоскина Н. В. Образование фенольных соединений в растениях рода *Rhododendron* L., полученных методом клонального микроразмножения // Тезисы докладов Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар. 2007. С. 179-180
8. **Костина В. М.**, Загоскина Н. В. Образование полифенолов в каллусных культурах рододендронов // Тезисы докладов Международного научно-практического семинара «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. 2008. С. 9-12
9. **Костина В. М.**, Алявина А. К., Загоскина Н. В. Образование и локализация фенольных соединений в каллусных культурах рододендрона // Тезисы докладов IX научной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Звенигород. 2008. С. 198-199
10. **Костина В. М.**, Загоскина Н. В. Образование флавонолов и хлорофилла у различных представителей рода *Rhododendron* L. // Тезисы докладов Международной научной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». Екатеринбург. 2008. С. 221-222
11. **Костина В. М.**, Алявина А. К., Загоскина Н. В. Вечнозеленый рододендрон Смирнова и его способность к образованию фенольных соединений // Вестник Тверского Государственного университета. Серия: биология и экология. 2009. Вып. 11. С. 30-35

Выражаю искреннюю признательность профессору Осипову В. И., к.б.н. Александровой М. С., к.б.н. Молкановой О. И., н.с. Васильевой О. Г. а также н.с. Алявиной А. К. за помощь в проведении исследований и научные консультации.

Подписано в печать: 12.02.2009

Заказ № 1563 Тираж - 100 экз.
Печать трафаретная.
Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru