

УДК 574.24: 577.13: 581.198

ВМІСТ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ТКАНИНАХ АЙРУ ЗВИЧАЙНОГО (*ACORUS CALAMUS* L.) ТА ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ ЗА УМОВ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO*

А. З. РЕВУЦЬКА, В. Н. БЕЛАВА, А. В. ГОЛУБЕНКО, Н. Ю. ТАРАН

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 03022, м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2
e-mail: nastartia@i.ua

Мета. З метою з'ясування біохімічних особливостей рослин *Acorus calamus* L. двох генотипів, отриманих із різних популяцій, було проведено аналіз фенольних сполук у тканинах експлантів та в живильному середовищі за умов культивування *in vitro*. **Методи.** Досліджували рослини, отримані шляхом мікроклонального розмноження. Для визначення загального вмісту фенолів використовували реактив Фоліна-Чекольте, загального вмісту флавоноїдів — нітрат кристалогідрату цирконіюхлориду (IV). Вміст ксантонів визначали за методами Височиної Г. І. та Кукушкиної Т. А. з власними модифікаціями. Екстракти аналізували спектрофотометрично. **Результати.** У тканинах мікроклонів *A. calamus* та живильному середовищі було виявлено різний якісний і кількісний склад фенольних сполук, який залежав від локалітету материнської рослини та тривалості культивування *in vitro*. **Висновки.** Оскільки експланти культивувалися за ідентичних умов, то відмінність вмісту фенольних сполук у рослинних тканинах та у живильному середовищі вказує на наявність генетичної мінливості рослин *A. calamus* на рівні популяцій.

Ключові слова. *Acorus calamus*, культура *in vitro*, феноли, флавоноїди, ксантони.

Вступ. Рослини є природним джерелом широкого спектру біологічно активних речовин (БАР), що належать до вторинних метаболітів, є надзвичайно цінною комерційною сировиною і знаходять застосування у медицині та фармацевтиці [1, 2]. Суттєва кількість вторинних метаболітів являє собою речовини фенольної природи: феноли, флавоноїди, ксантони, ізофлавоноїди, таніни, лігнін, лігнани тощо. Біосинтез фенолів відбувається із фенілаланіну трьома шляхами (шикиматним, ацетатно-малонатним та ацетатно-мевалонатним). Флавоноїди, що також утворюються із фенілаланіну і малоніл-СоА, що беруть участь у регуляції клітинного метаболізму, експресії генів, захищають від оксидного стресу, а також накопичуються в мембранах клітин, де взаємодіють із рецепторами та сигнальними трансдукторами [3–6]. Натомість синтез ксантонів починається із перетворення шикимової кислоти на фенілаланін. Ця амінокислота втрачає два атоми карбону із бічного ланцюга і окиснюється до метагідроксибензойної кислоти, яка у свою чергу конденсується з трьома ацетатним залишками з утворенням інтермедіату, що циклізується в заміщений бензофенон, який у залежності від типу радикалів перетворюється на різні ксантони шляхом утворення центрального кільця при окисненні фенольного зв'язку. [7]. Ксантони належать до спектру рослинних сполук, що виконують захисну функцію від патогенних мікроорганізмів і траводічних тварин. Вони синтезуються конститутивно або накопичуються у відповідь на інфікування [8]. Завдяки антибактеріальним, протипухлинним, антиоксидантним та іншим властивостям ксантони активно використовуються в медицині і фармакології, а також як біодобавки [9].

Рід *Acorus* (Аір) — рід вищих рослин, що налічує 40 видів. Переважно це водні чи прибережні рослини. Представники роду *Acorus* зростають у помірних та субтропічних зонах із помірним кліматом [10, 11].

В Україні рід представлений єдиним видом — *Acorus calamus* (аїр звичайний), який поширений у Європейській частині лісостепової зони (крім Карпат і Донецької області). Вид не вважається рідкісним, але з кожним роком його ареал скорочується внаслідок антропогенних чинників: знищення його місць зростання, забруднення водойм, збиранням його як лікарської та ритуальної сировини майже у промислових масштабах. Аїр звичайний не є аборигенним видом і розмножується на території України лише вегетативно, тому генетичні особливості окремих популяцій можуть вказувати як на їхнє походження, так і на тривалість перебування та особливості розповсюдження [12].

Деякі представники роду, такі як *A. calamus* L., *A. tatarinovii* (Schott.), *A. gramineus* (Solland) Ait), відомі своїми цілющими властивостями, оскільки синтезують цілий ряд біологічно активних речовин. Впродовж століть рослини аїру традиційно використовуються в китайській та індійській медицині для лікування діареї, бронхіальної астми, психічних розладів. Також виявлені знеболювальні, протисудомні, спазмолітичні, протизапальні, цитопротекторні, заспокійливі та інші властивості препаратів аїру.

Цікавим є факт, що різновиди аїру відрізняються за продуктивністю, яка визначається як умовами зростання, так і генотипові. Часто це пов'язують із ступенем плідності. За хімічними критеріями ці різновиди об'єднують у так звані хемораси. Можна припустити, що в Україні також існують окремі хемораси *A. calamus*. Біохімічні, генетичні та морфогенетичні відмінності між різними популяціями аїру в Україні досліджені недостатньо, як у природі, так і в культурі *in vitro* [12]. Тому метою нашої роботи було з'ясувати особливості накопичення речовин фенольної природи (фенолів, флавоноїдів та ксантонів) у тканинах вирощених *in vitro* рослин аїру та у живильних середовищах, на яких вони культивувалися, та встановити, чи залежать вони від походження материнських рослин.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були отримані в результаті клонального мікророзмноження рослини аїру звичайного з двох природних популяцій Національного природного парку «Пирятинський» (Аїр № 1) та м. Біла Церква (Аїр № 2) (рис. 1).



Рис.1. Мікроклони аїру звичайного з популяції НПП «Пирятинський» у віці 3 місяців (вилучені з живильного середовища).

Експланти вирощували впродовж 3 і 5 місяців на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з розведеним удвічі вмістом мінеральних солей, доповненому 100 мг/л мезоінозиту, вітаміни (В1 і В6 по 05 мг/л і РР — 1 мг/л) без додавання регуляторів росту. Рослини культивували за температури 24 °С, при фотоперіоді 16 годин [13]. Для визначення вмісту фенольних сполук досліджували окремо корені і листки експлантів. Водночас, досліджували на вміст фенольних сполук і живильні середовища, на яких культивували рослини аїру.

Загальний вміст фенолів у рослинному матеріалі та живильному середовищі визначали за допомогою реактиву Фоліна-Чекольте [14, 15] з модифікаціями. Для визначення загального вмісту флавоноїдів використовували 0,2 % розчин нітрату кристалогідрату цирконіюхлориду (IV) і рутин як стандарт [16, 17]. Для визначення вмісту ксантонів у рослинному матеріалі та живильному середовищі використовували методи Височинової Г. І. [18] та Кукушкиної Т. А. [19] з власними модифікаціями. Отримані екстракти з рослинного матеріалу та живильного середовища аналізували спектрофотометрично (СФ SHIMADZU UV — 1800). Біологічна повторність дослідів 3-х разова, аналітична — 9-ти разова. Результати оброблені статистично з використанням загальноприйнятих методик. В роботі представлені середні дані, відмінності між варіантами дослідів вважали вірогідними при рівні значимості $P \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента [20].

Результати та обговорення

Під час експериментів у тканинах експлантів аїру звичайного нами було виявлено кількісні та якісні відмінності у складі речовин фенольної природи в залежності від локалітету материнської рослини, а також від часу їх культивування за умов *in vitro*.

Так, дослідження загального вмісту фенолів показало, що у тканинах експлантів Аї-

ру № 1 цей показник зростає із часом культивування як у листках (з 0,07 мг/г до 0,11 мг/г сухої речовини), так і в коренях (з 0,06 мг/г до 0,15 мг/г сухої речовини) (рис. 2а). Натомість, у тканинах експлантів Аїру № 2 накопичення фенолів відбувалось лише у листках (із 0,09 мг/г до 0,19 мг/г сухої речовини), а в коренях, навпаки, їхній вміст знижувався (з 0,21 мг/г до 0,07 мг/г сухої речовини) (рис. 2б).

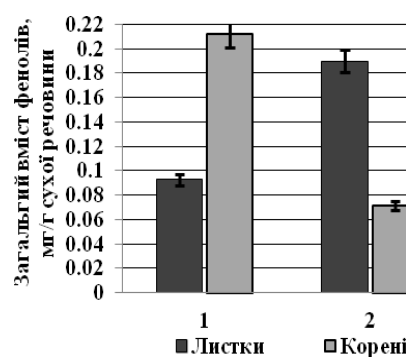
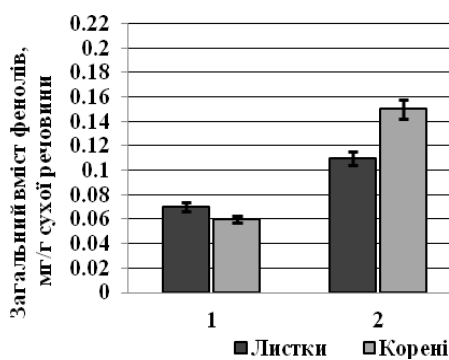


Рис. 2. Загальний вміст фенолів у тканинах експлантів аїру звичайного: а) рослини Аїру № 1; б) рослини Аїру № 2; 1) тривалість культивування 3 місяці; 2) тривалість культивування 5 місяців.

Дослідження загального вмісту фенолів у живильному середовищі, на якому вирощували експланти аїру звичайного, виявило незначне

зростання цього показника в часі як для Аїру № 1 (на 0,58 мг/г сухої речовини), так і для Аїру № 2 (на 0,26 мг/г сухої речовини) (рис. 3а, 3б).

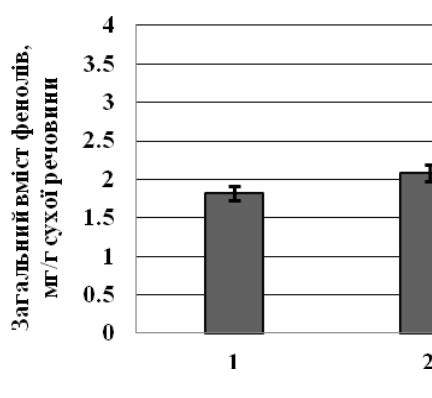
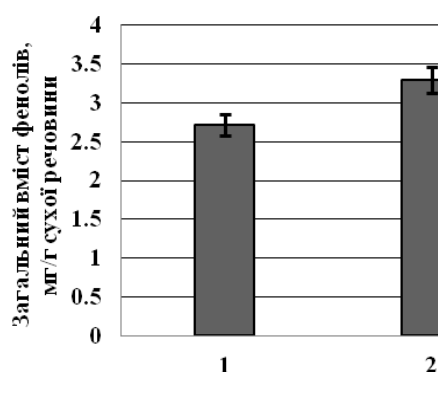


Рис. 3. Загальний вміст фенолів у живильному середовищі, на якому вирощували експланти аїру звичайного в умовах *in vitro*: а) середовище експлантів Аїру № 1; б) середовище експлантів Аїру № 2; 1) тривалість культивування 3 місяці; 2) тривалість культивування 5 місяців.

При дослідженні загального вмісту флавоноїдів нами було виявлено зниження вмісту цих сполук з часом в експлантах Аїру № 1 — майже у 7 разів у листках і в 1,3 рази у коренях

(рис. 4а). У тканинах експлантів Аїру № 2 вміст цих речовин збільшився в 1,4 рази у листках і у 2 рази в коренях (рис. 4б).

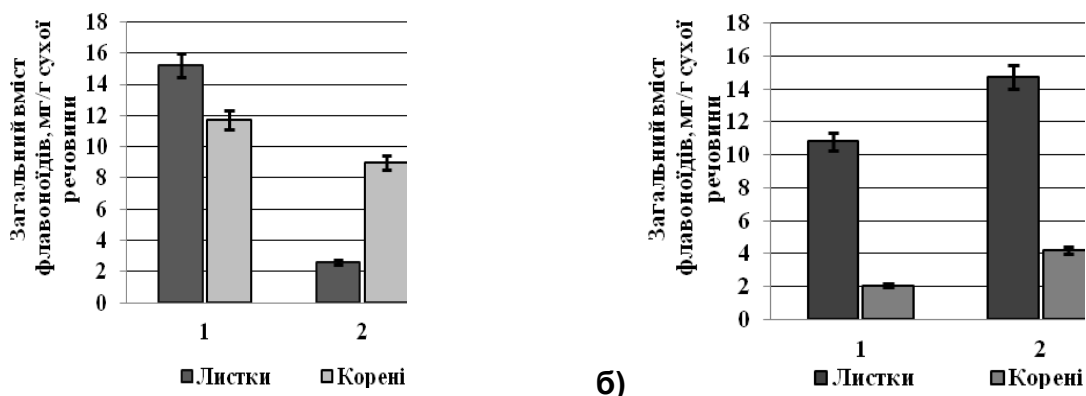


Рис. 4. Загальний вміст флавоноїдів у тканинах експлантів аїру звичайного: а) експланти Аїру № 1; б) експланти Аїру № 2; 1) тривалість культивування 3 місяці; 2) тривалість культивування 5 місяців.

Визначення складу та вмісту ксантонів також виявило низку відмінностей у рослин з різних локалітетів. Цікавим є факт, що у тканинах (в листках та в коренях) експлантів аїру нами було виявлено лише один ксантон — свержірин (максимум поглинання 277 нм), в той час, як, наприклад, у тканинах експлантів *Phalaenopsis sp.* в умовах *in vitro* ми зареєстрували чотири представники ксантонів, які належать до класу англярних дигідропіраноксантонів [21]. У листках Аїру № 1 вміст свержірину становив 1,23 % від маси сирої речовини за культивування протягом 3 місяців та 1,25 % від маси сирої речовини за вирощування впродовж 5 місяців, тобто залишався на постійному рівні (в межах похибки) (рис. 5а). На відміну від Аїру № 1 в листках Аїру № 2 ми спостерігали підвищення концентрації

свержірину з 1 % протягом 3 місяців до 1,20 % від маси сирої речовини за 5 місяців (рис. 5б). У коренях експлантів Аїру № 1 кількість свержірину від маси сирої речовини була 1,03 % при вирощуванні протягом 3 місяців, а при культивуванні протягом 5 місяців була вдвічі меншою — 0,50 %. У коренях Аїру № 2 його вміст від маси сирої речовини, навпаки, збільшився від 0,65 % при культивуванні 3 місяці до 0,74 % за 5 місяців. Тобто, у експлантах Аїру № 2 ми спостерігали накопичення свержірину як у листках, так і в коренях впродовж усього експерименту. Це підтверджує важливість необхідності обирати для введення в культуру *in vitro* з метою виділення ксантонів ті популяції рослин, представники яких здатні синтезувати і акумулювати більшу кількість даних сполук.

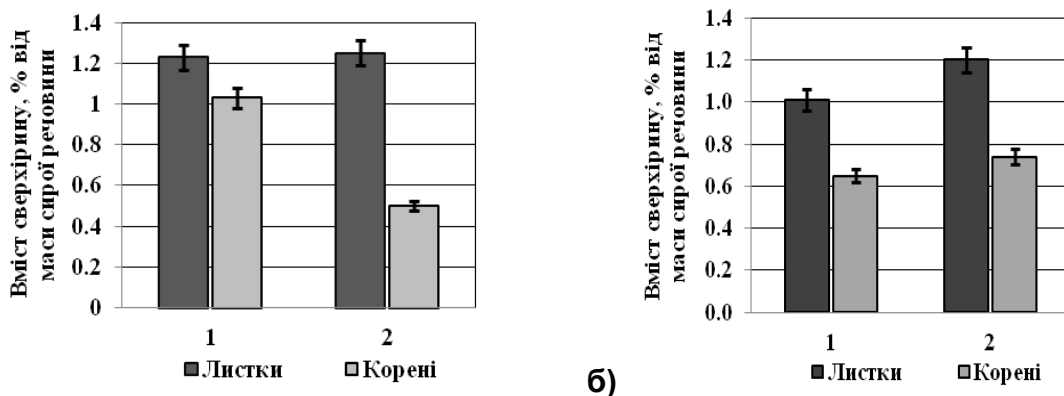


Рис. 5. Вміст свержірину у тканинах експлантів аїру звичайного, %: а) експланти Аїру № 1; б) експланти Аїру № 2; 1) експозиція 3 місяці; 2) експозиція 5 місяців.

У живильних середовищах, на яких вирощували експланти аїру звичайного і які розглядаються як можливе джерело додаткової кількості цінних вторинних метаболітів, нами було виявлено три представника класу ангулярних дигідропіраноксантонів і один представник ксантолігноїдів, вміст яких змінювався в залежності від часу культивування: свержірин (максимум поглинання 277 нм), декусатин (максимум поглинання 260 нм), 1-гідрокси-2,3,5-триметоксиксантон (максимум поглинання 257 нм) (ангулярні дигідропіраноксантони) та мангостенон А (ксантолігноїд, що має максимум поглинання 285 нм) (рис. 6 і рис. 7). Оскільки ці ксантони, крім свержірину, не виявлені у рослинних тканинах, можна зробити припущення, що їх синтез відбувається в коренях, звідки вони виділяються у зовнішнє середовище.

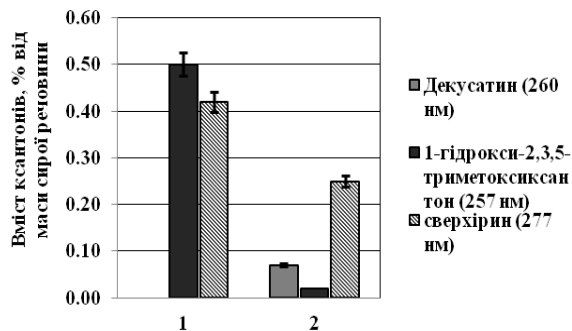


Рис. 6. Вміст ксантонів у живильному середовищі, на якому вирощували експланти Аїру № 1: 1) тривалість культивування 3 місяці; 2) тривалість культивування 5 місяців.

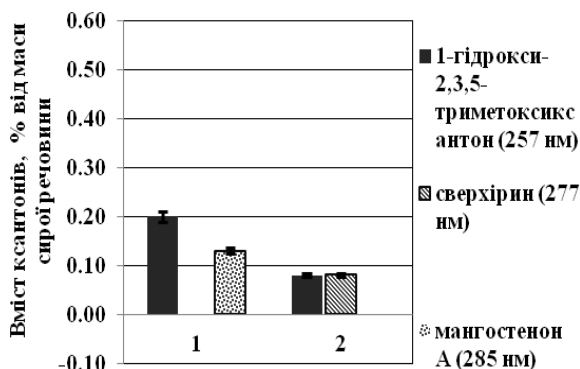


Рис. 7. Вміст ксантонів у живильному середовищі, на якому вирощували експланти Аїру № 2: 1) тривалість культивування 3 місяці; 2) тривалість культивування 5 місяців.

Аналіз складу ксантонів середовища культивування Аїру № 1 показав, що, так як і в лист-

ках та коренях, у середовищі, на якому вирощували ці експланти, кількість свержірину знижувалася — у 2 рази впродовж досліду (з 0,42 % до 0,25 % від маси сирової речовини при експозиції 3 та 5 місяців), тобто не можна сказати, що зменшення рівня цієї сполуки в тканинах рослин супроводжувалося виділенням та накопиченням в середовищі.

Вміст 1-гідрокси-2,3,5-триметоксиксантону у середовищі, на якому вирощували експланти Аїру № 1, падав впродовж досліду (з 0,5 % до 0,02 % від маси сирової речовини). Тобто, в процесі росту та розвитку експлантів скорочується синтез в рослинних тканинах (і, відповідно, виділення назовні), а у середовищі відбувається руйнування цього ксантону.

Аналіз складу ксантонів середовища культивування Аїру № 2 показав, що ксантон свержірин присутній у малій кількості і лише у варіанті більш тривалого вирощування (5 місяців). Тобто, при високому рівні синтезу у рослинних тканинах, накопичення його у середовищі не відбувається впродовж досліду. У культивуваних середовищах аїру різних популяцій було виявлено відмінні ксантони: декусатин (експозиція 5 місяців — Аїр № 1) та мангостенон А (експозиція 3 місяці — Аїр № 2).

Відомо, що біохімічні властивості рослин-продуцентів залежать як від умов зростання (культивування), так і від інформації, закладеної у їхньому геномі, а мінливість у межах виду на рівні популяції зберігається і в культурі *in vitro*. Така мінливість насамперед виявляється у особливостях морфогенезу *in vitro* та здатності синтезувати вторинні метаболіти [22, 23]. Отримані дані про кількісний вміст та склад вторинних метаболітів у тканинах експлантів та в середовищі за умов вирощування *in vitro* свідчать про те, що ці показники відрізняються у рослин виду різного походження та, ймовірно, знаходяться під контролем геному, що дає підставу для подальших біохімічних та генетичних досліджень і ретельного відбору материнських рослин для отримання рослин-регенерантів (мікроклонів) як джерела біологічно активних речовин.

Висновки

Відмінність якісного та кількісного складу речовин фенольної природи у тканинах, вирощених *in vitro*, рослин аїру звичайного, які походять від материнських рослин двох популяцій, та у живильному культивувальному середовищі, свідчить про залежність біосинтезу цих сполук від фізіологічних та генетичних особливостей представників досліджуваних популяцій, що викристалізувалися в процесі пристосування до мінливих умов довкілля. Аїр звичайний можна використовувати як альтернативне джерело даних речовин і, тим самим,

сприяти збереженню рідкісних і цінних лікарських видів рослин, які їх синтезують. Дослідження вмісту фенольних сполук у рослинних тканинах та специфіки накопичення у живильних середовищах є перспективними та потребують подальшого розвитку з розширенням спектру видів рослинного матеріалу та культивацийних середовищ.

Перелік літератури

1. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human // J. of Medicinal Plants Research. — 2011. — Vol. 5, No 31. — P. 6697–6703.
2. Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (Second Edition) // Annual Plant Reviews. — 2010. — Vol. 40. — 481 p.
3. Gao J., Wang S. J., F. Fang et al. Xanthones from Tibetan medicine *Halenia elliptica* and their antioxidant activity // Jian-gong S. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. — 2004. — Vol. 26., No 4. — P. 364–367.
4. Ramakrishna A., Aswathanarayana Ravishankar G. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signaling & Behavior. — 2011. — Vol. 6, No 11. — P. 1720–1731.
5. Sarawut J. Xanthones from Mangosteen (*Garcinia mangostana*): Multi-targeting Pharmacological Properties // J. Med. Assoc. Thai. — 2014. — Vol. 97, No 2. — P. 196–201.
6. Bhattacharya A. et al. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection — Review // Mol Plant Pathol. — 2010. — Vol. 11, No 5. — P. 705–719.
7. Mengwasser J. H. Lead compounds from nature: Synthesis of natural xanthones and chroman aldehydes that inhibit HIV-1 // Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. — 2011. — 106 p.
8. Fiesel T., Gaid M., Müller A. et al. Molecular cloning and characterization of a xanthone prenyltransferase from *Hypericum calycinum* cell cultures // Molecules. — 2015. — Vol. 20. — P. 15616–15630.
9. Franklin G. et al. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress // Phytochemistry — 2009. — Vol. 70. — P. 60–68.
10. Devi S. A., Bawankar R., Babu S. Current status on biological activities of *Acorus calamus* — A Review // Int J Pharm Pharm Sci. — 2014. — Vol 6, No 10. — P. 66–71.
11. Vijayapandi P., Anabathina A. K., Srikanth S. N. *In vitro* anticholinergic and antihistaminic activities of *Acorus calamus* linn. Leaves extracts / J. Tradit Complement Altern Med. — 2013. — V. 10(1). — P. 95–101.
12. Голубенко А. В., Цап В. М. Клональне мікророзмноження рослин *Acorus calamus* L. *in vitro* // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. — 2016. — В. 1, No 34. — С. 54–56.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.
14. Bobo-García G., Davidov-Pardo G., Arroqui C. / Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. // J. Sci. Food Agric. — 2015. — Vol. 95, No 1. — P. 204–209.
15. Li X., Kim J. K., Park S. Y. Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of Tanno-original and Tanno-high rutin buckwheat // J. Agric. Food Chem. — 2014. — Vol. 62, No 12. — P. 2701–2708.
16. Smirnov O. E., Kosyan A. M., Kosyk O. I., Taran N. Yu. Response of phenolic metabolism induced by aluminium toxicity in *Fagopyrum esculentum* moench. plants // Ukr. Biochem. J. — 2015. — Vol. 87, No 6. — P. 129–135.
17. Petry R. D., Ortega G. G., Silva W. B. Flavonoid content assay: influence of thereagent concentration and reaction time on thespectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex // Pharmazie. — 2011. — Vol. 56, No 6. — P. 465–470.
18. Височина Г. И., Кукушкина Т. А. Биологически активные вещества некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия растительного сырья. — 2011. — No 4. — С. 251–258.
19. Кукушкина Т. А., Зиннер Н. С., Височина Г. И., Свиридова Т. П. Содержание ксантонов в надземной части растений *Hedysarum theinum krasnob.* и *h. Alpinum* (L.) (Fabaceae) при выращивании в Сибирском ботаническом саду (Томск) // Химия растительного сырья. — 2011. — No 3. — С. 113–116.
20. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М. : Агропромиздат. — 1985. — 350 с.
21. Ревуцька А. З., Белава В. Н., Голубенко А. В., Таран Н. Ю. Екобіотехнологічні підходи для отримання *in vitro* ксантонів — фармакологічно цінних сполук. — Тези // «Екологія та екологічна безпека: Матеріали науково-практичної конференції всеукраїнського студентського конкурсу» (16–18 березня 2016 року). — Полтава : ПолтНТУ. — 2016. — С. 77.
22. Твардовська М. О., Дробик Н. М., Мельник В. М., Конвалюк І. І., Кунах В. А. Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana* L. у природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз // Biopolym. Cell. — 2010. — Vol. 26, № 6. — P. 499–507.
23. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К. : Логос, 2005. — 730 с.

Представлена Кунахом В. А.
Надійшла 25.10.2016

CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ACORUS CALAMUS L. TISSUE CULTURE AND NUTRIENT CULTURE MEDIUM UNDER IN VITRO CONDITIONS

A. Z. Revutska, V. N. Belava, A. V. Golubenko, N. Yu. Taran

Educational and Scientific Centre
«Institut of Biology and Medicine» Taras Shevchenko
National University of Kyiv
Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Glushkova Avenue, 2
e-mail: nastartia@i.ua

Aim. To find out the biochemical peculiarities of *Acorus calamus* L. of the two genotypes, acquired from different populations, an analysis of phenolic compounds in explant tissues and in nutrient medium *in vitro* was conducted.

Methods. Plants, acquired by microclonal multiplication were studied. To detect general phenol content, Folin-Ciocalteu reagent was used, for flavonoid content — zirconium chloride crystallohydrate nitrate (IV). Xanthone content was identified by Vysochina G. I. and Kukushkina T. A. methods with our own modifications. The extracts were studied using spectrophotometric measurements. **Results.** Tissues of *A. calamus* and the nutrient medium contained different amount of phenolic compounds, depending on parent plant origin and *in vitro* cultivation duration. **Conclusions.** Since the explants were cultivated in identical conditions, the difference of phenolic compound content both in tissues and nutrient medium indicates genetic variability of *A. calamus* plants on population level.

Keywords. *Acorus calamus*, culture *in vitro*, phenols, flavonoids, xanthones.