

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

БЮЛЛЕТЕНЬ ГНБС

Выпуск 147

Ялта 2023

Учредитель и издатель

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН»

Главный редактор

Юрий Владимирович Плугатарь

Заместитель главного редактора

Оксана Михайловна Шевчук

Редакционная коллегия

Ч.Р. Азвас (Бангалоре, Индия)	В.В. Корженевский (Ялта, Россия)
Н.А. Багрикова (Ялта, Россия)	И.В. Костенко (Ялта, Россия)
Е.Б. Балыкина (Ялта, Россия)	А.Н. Кузнецов (Москва, Россия)
С.М. Бебия (Сухум, Абхазия)	Н.В. Лебедева (Мурманск, Россия)
В.М. Горина (Ялта, Россия)	Ф.Б. Мусаев (Москва, Россия)
Т.Б. Губанова (Ялта, Россия)	А.Е. Палий (Ялта, Россия)
В.И. Долженко (Санкт-Петербург, Россия)	С.А. Приходько (Донецк, ДНР)
Т.В. Долженко (Санкт-Петербург, Россия)	А.В. Рындин (Сочи, Россия)
Н.Б. Ермаков (Ялта, Россия)	А.П. Серегин (Москва, Россия)
О.А. Ильницкий (Ялта, Россия)	Н.И. Сидельников (Москва, Россия)
В.П. Исиков (Ялта, Россия)	А.В. Смыков (Ялта, Россия)
Н.Н. Карпун (Сочи, Россия)	К. Таммасири (Бангкок, Таиланд)
З.К. Клименко (Ялта, Россия)	В.В. Титок (Минск, Беларусь)
О.Е. Клименко (Ялта, Россия)	С.В. Шевченко (Ялта, Россия)
В.П. Коба (Ялта, Россия)	А.М. Ярош (Ялта, Россия)

Издание включено в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, распоряжением Минобрнауки России от 12 февраля 2019 г. № 21-р

Издание включено в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)
Научной электронной библиотеки <http://elibrary.ru>
Всем статьям присваивается DOI (идентификатор цифрового объекта)

Выходит 4 раза в год

Подписной индекс в каталоге агентства «Урал-Пресс»: 58307

СОДЕРЖАНИЕ

Эфиромасличные и лекарственные растения. Биохимия растений

- Plugatar Yu.V., Shevchuk O.M., Soltani G.A., Sakhno T.M., Feskov S.A., Fedotova I.A.
Screening studies of woody plants as sources of essential oils 7
- Аджиахметова С.Л., Попов И.В., Попова О.И., Оганесян Э.Т.
Исследование морфолого-анатомических признаков и макро- и микроэлементного состава сырья омелы белой (*Viscum album* L.) 18
- Айрапетян Э.Э., Логвиненко Л.А., Коновалов Д.А.
Изучение эфирного масла и фенольных соединений полыни метельчатой селекции Никитского ботанического сада 28
- Бакова Н.Н., Сатаева Т.П., Постникова О.Н., Феськов С.А., Федотова И.А., Сусллова А.А.
Физико-химический состав и биологическая активность гидролатов новых сортов чабреца 37
- Белоус О.Г., Паштецкая А.В., Платонова Н.Б.
Содержание некоторых биологически активных веществ в листьях *Olea europaea* L. 49
- Коростылев А.А.
Морфолого-биологические особенности семян *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. при интродукции на Южный берег Крыма 56
- Логвиненко Л.А., Шевчук О.М., Голубкина Н.А., Коростылев А.А.
Биохимические особенности морфоформ *Myrtus communis* L. в условиях культуры на Южном берегу Крыма 63
- Паштецкая А.В., Бакова Н.Н., Пехова О.А., Данилова И.Л., Карпова А.Н.
Оценка качества продуктов переработки плодов *Olea europaea* L., произрастающей в условиях Южного берега Крыма 72
- Приходько С.А., Кустов Д.Ю., Кустова О.К., Глухов А.З.
Влияние настоя *Ziziphora bungeana* Juz. на лейкоцитарную формулу крови крыс с моделью ревматоидного артрита 83
- Рощина В.В., Солтани Г.А., Фатерыга В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М.
Спектральные исследования поверхности клетки для выявления азуленов в растениях 90
- Федотова И.А., Кустова О.К., Шевчук О.М., Шпилевая Н.В., Остапко В.М.
Хемотипическое разнообразие представителей рода *Thymus* L. коллекции Донецкого ботанического сада 96
- Феськов С.А., Шевчук О.М., Опалинский В.П., Левицкий С.А.
Tagetes minuta L. – перспективная эфиромасличная культура для Северного Присивашья 108
- Чичканова Е.С., Сатаева Т.П., Бакова Н.Н., Палий А.Е., Федотова И.А., Мелкозёрова Е.А., Шевчук О.М.
Компонентный состав и биологическая активность гидролата *Aloe vera* L. 118
- Ботаника и экология**
- Костин С.Ю.
Особенности географо-генетической структуры фауны птиц крымского полуострова 127
- Сволынский А.Д., Иванов С.П., Курамова В.В.
Особенности анэкологии *Orchis mascula* L. (Orchidaceae) в Крыму: фенология цветения, пространственное распределение и морфометрия генеративных особей 135

УДК 577.3

DOI: 10.25684/0513-1634-2023-147-90-95

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЗУЛЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

Виктория Владимировна Рощина¹, Галина Александровна Солтани²,
Валентина Витальевна Фатерыга³, Надежда Константиновна Призова¹,
Любовь Михайловна Хайбулаева¹

¹Институт биофизики клетки, Пущинский биологический центр РАН,
142290, Россия, г. Пущино Московской области, Институтская, 3

²ФГБУ «Сочинский национальный парк»,
354002, Россия, г. Сочи, Курортный проспект, 74

³Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН –
филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН,
Курортное, Феодосия, Россия

E-mail: roshchinavic@mail.ru¹, soltany2004@yandex.ru², valentina_vt@mail.ru³

Рассмотрена возможность применения спектральных методов исследования для определения азуленов на поверхности клеток растений, перспективных в качестве фармакологического сырья. Исследована поверхность листьев с голубой или серебристой окраской у *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., *Hippophae rhamnoides* L., хвои и шишкочегод *Juniperus excelsa* M. Bieb. и *Juniperus × pfitzeriana* (Späth) P.A.Schmidt 'Blue Cloud'. С помощью микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометра в спектрах поглощения листьев и шишкочегод отмечены характерные для азуленов и хлорофилла максимумы 580-620 н.м и 660-666 н.м, соответственно. Для подтверждения присутствия азуленов в образцах получали 10 минутные экстракты с поверхности интактных клеток 100% ацетоном или 95% этанолом. Содержание азуленов в таких экстрактах составило в мг/г сырой массы в листьях *Eucalyptus cinerea* 12.5±0.02 и *Hippophae rhamnoides* – 1.0±0.1, а в хвое и шишкочегодах можжевельников *Juniperus excelsa* – 1.76/1.46±0.3/0.2 и *Juniperus × pfitzeriana* 'Blue Cloud' 0.55/2.96/±0.01/0.3, соответственно. Все исследованные древесные культуры могут быть источниками азуленов.

Ключевые слова: клеточная стенка; кутикула; поглощение; секреторные клетки; флуоресценция

Введение

Растения содержат большое количество автофлуоресцирующих молекул, которые могут быть использованы для биохимических, физиологических исследований или визуализации [6]. Поверхность разных типов клеток растений отличается чувствительностью к изменениям концентрации тропосферного озона, засолению, травмирующим факторам. Внешние сигналы в первую очередь воспринимают компоненты клеточной стенки и плазмалеммы, и они должны создавать защиту от проникновения токсичных веществ к плазмалемме и вглубь клетки. В одних и тех же тканях может присутствовать несколько типов автофлуоресцирующих молекул, и, таким образом, источник автофлуоресценции следует интерпретировать в сочетании с гистохимическим окрашиванием и другими формами анализа [6]. Начиная со второй половины XX века внимание научного сообщества было обращено на синие пигменты – азулены, с присутствием которых связан голубой цвет поверхностей листьев и плодов [3, 5]. У таких растений, содержащих азулен в слоях кутикулы и клеточной стенки поверхностных клеток листьев, отмечена повышенная устойчивость к негативному влиянию тропосферного озона [3].

Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных. Благодаря физико-химическим свойствам азулен и его производные

нашли множество потенциальных применений в технике, особенно в оптоэлектронных устройствах. В медицине ингредиенты этих растений широко использовались в течение сотен лет в противоаллергической, антибактериальной и противовоспалительной терапии [4]. В данной статье рассмотрена возможность применения спектральных методов исследования для определения азуленов на поверхности клеток растений, перспективных в качестве фармакологического сырья.

Объекты и методы исследования

Группа моделей включала образцы с голубыми поверхностными структурами, собранные в 2021-2022 гг. Исследованы поверхности листьев с голубой или серебристой окраской у эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) из сочинского «Дендрария» и облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., собранной на побережье реки Оки ботанического заказника г. Пущино; листья и шишкоягоды можжевельника высокого *Juniperus excelsa* M. Bieb. из Карадагского заповедника (Феодосия, Крым) и можжевельника × Пфизера 'Блю Клауд' *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A.Schmidt 'Blue Cloud' (Cupressaceae) из парка "Дендрария" Сочинского национального парка (рис. 1). По мнению Krussman's этот сорт *Juniperus* × *pfitzeriana* (синоним *J.* × *media* Melle, либо причисляемый к *J. sabina* L.) является спонтанным гибридом *J. sabina* и *J. virginiana*, полученный в 1955 г. в Голландии [2].



А



Б



В



С

Рис. 1 А - *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Б- *Hippophae rhamnoides* L., В - *Juniperus excelsa* M. Bieb. В - *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A. Schmidt 'Blue Cloud'

Поглощение, собственную флуоресценцию клеток до и после гистохимической обработки (см. гистохимический анализ) измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США), микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Россия), спектрофлуориметра *Perkin-Elmer 350 MPF-44B* (UK) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа *Leica TCS SP-5* (Германия – Австрия – США). Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, выше упомянутого конфокального микроскопа и микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (Россия). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95% этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 1-0.5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью выше упомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра. Для выявления азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля *Silufol*, как описано ранее для пыльцы ряда семенных растений и микроспор хвоща [3]. Затем регистрировали их спектры поглощения и флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными на интактных клетках. Среднюю ошибку опыта из трех-четырех повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля, соответственно.

Концентрацию азуленов (A в молях, молекулярный вес азулена 128, 18) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

$$A = D_{580} / \varepsilon \times l,$$

где D_{580} – оптическая плотность при 580 нм, ε – коэффициент молярной экстинкции $328 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, l – толщина слоя жидкости в кювете, см. В работе использовали азулен фирмы “Fluka” (Германия).

Результаты и обсуждение

Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала и может также быть защитным барьером, если включает соответствующие компоненты, защищающие клетку от любого повреждения. Из отобранных нами растений с голубой и серебристой окраской листьев, два вида древесных растения относились к Голосеменным, а два вида – к Покрытосеменным. Более голубыми являлись листья эвкалипта пепельного и хвоя можжевельника Пфитцера 'Блю Клауд'.

С помощью микроскопии в проходящем свете и люминесцентной микроскопии, включая микроспектрофлуориметрию/микроспектрофотометрию, мы исследовали листья и шишкочагоды древесных растений, получая их фотоизображения и спектры поглощения (рис. 2, 3).

В спектре поглощения поверхности можно обнаружить максимумы, свойственные различным соединениям (400-460 н.м и 500-530 н.м – фенолы, 570-620 н.м – азулены и 660-666 н.м – хлорофилл) [3]. Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометре имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения согласно работе В.М. Золотарева [1].

С помощью этого прибора в спектрах поглощения листьев и шишкочагод различных видов (рис. 2) отмечены характерные для азуленов и хлорофилла максимумы 580-620 н.м и 660-666 н.м, соответственно.

Первая производная от спектра внешнего отражения для полос малой интенсивности позволяет непосредственно определить положение максимума полосы поглощения.

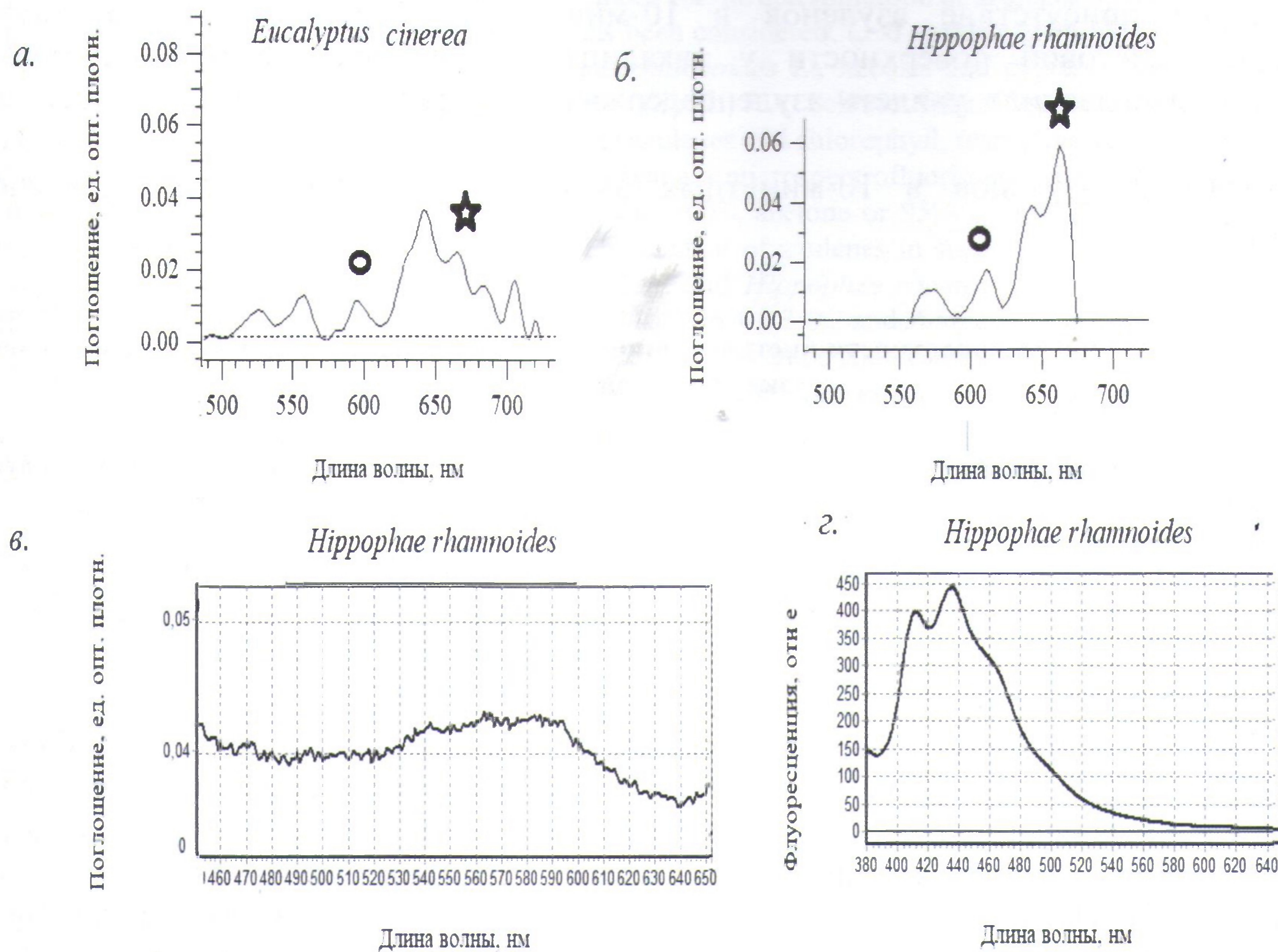


Рис. 2 Спектры поглощения поверхности листьев эвкалипта пепельного (а) и облепихи крушиновидной (б), в и г – спектры поглощения и флуоресценции этанольного экстракта после 10-минутной экспозиции листьев. Кружки – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимум 660 нм

У развитых листьев исследованных видов в диапазоне 500-700 н.м видны максимумы поглощения в области 550-560 н.м, 580-610 н.м (область азуленов), 625 и 660-666 н.м (характерны для хлорофилла) (рис. 3).

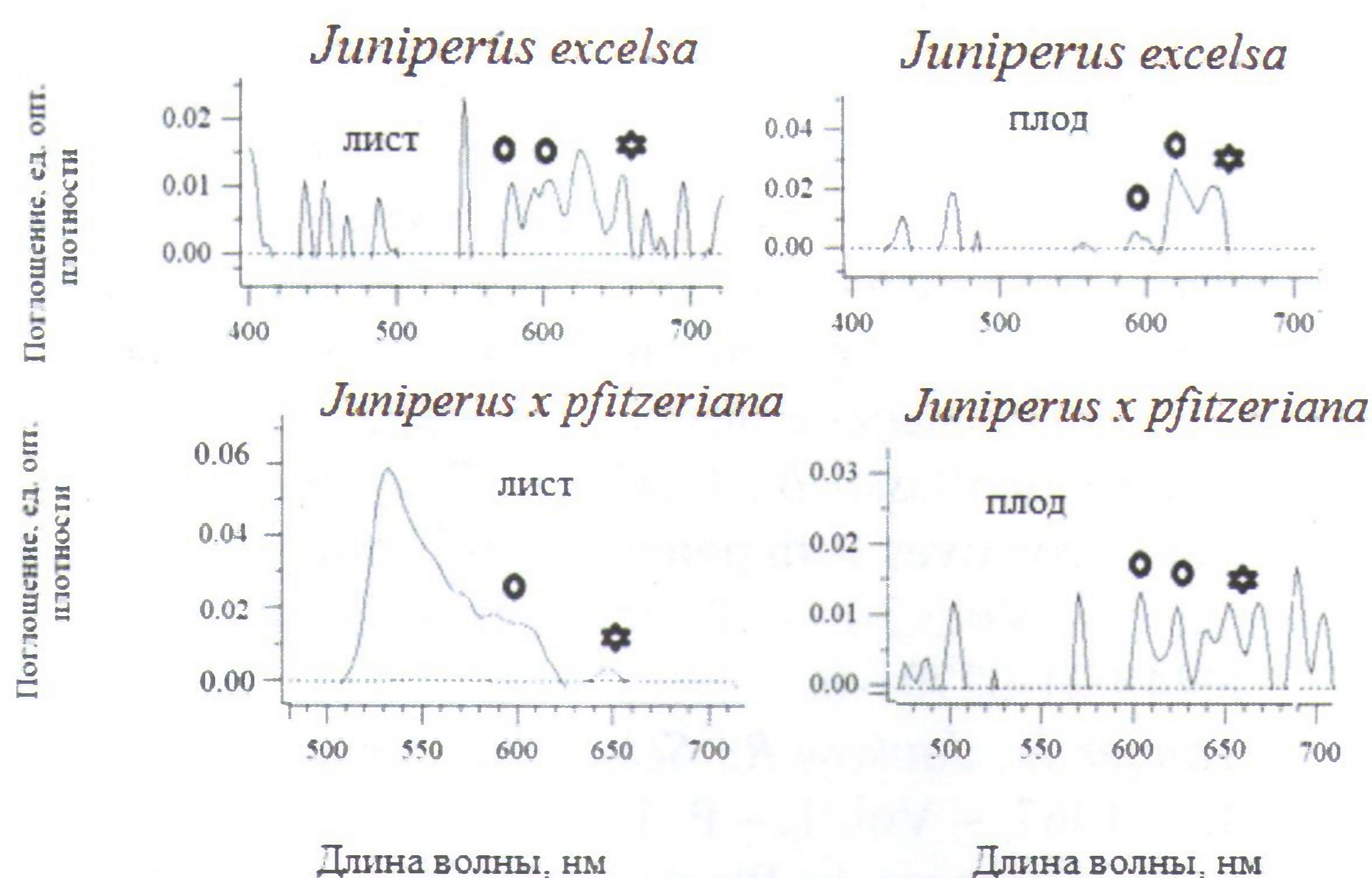


Рис. 3 Спектры поглощения поверхности листьев и шишкочког можжевельников высокого и м. Пфизера 'Блю Клауд'. Кружки – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимум 660 нм

Показано присутствие азуленов в 10-минутных спиртовых или ацетоновых экстрактах листовой поверхности у эвкалипта и облепихи. Микросканирование поверхности позволило увидеть азуленосодержащие соединения на поверхностях (см. рис. 3).

Содержание азуленов в 10-минутных этаноловых экстрактах представлено в таблице 1.

Таблица 1

Содержание азуленов на поверхности листьев и шишкочкогод, полученное 10-минутным спиртовым экстрагированием.

Название растения	Сырьё	Азулены, мг/г сырой массы
<i>Eucalyptus cinerea</i>	листья	12,5 ± 0,02
<i>Hippophae rhamnoides</i>	листья	1,0 ± 0,1
<i>Juniperus excelsa</i>	листья/шишкочкогоды	1,76/1,46 ± 0,3/0,2
<i>Juniperus</i> × <i>pfitzeriana</i> 'Blue Cloud'	листья/шишкочкогоды	0,55/2,96/ ± 0,01/0,3

Выводы

Было выяснено, что у эвкалипта пепельного поверхность содержит наибольшее количество азуленов из этих четырех видов. Сравнение листьев и шишкочкогод у можжевельников показало, что у можжевельника высокого наибольшая концентрация в листьях, несколько меньшая – в шишкочкогодах, тогда как у можжевельника Пфизера 'Блю Клауд' в шишкочкогодах значительно больше азуленов, чем на поверхности листьев. В листьях облепихи больше азуленов, чем в листьях можжевельника Пфизера 'Блю Клауд'.

Все исследованные древесные культуры могут быть источниками азуленов, но промышленное производство азуленов удобнее осуществлять путем экстракции с поверхности шишкочкогод, не повреждая растения. Спектральные методы предварительного тестирования присутствия азуленов могут быть рекомендованы в лабораторной практике и не требуют большого количества фармацевтического материала для анализа.

Список литературы

1. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения // Оптика и спектроскопия. – 2012. – № 112 (1). – С. 150-154.
2. Матюхин Д.Л., Манина О.С., Королева Н.С. Виды и формы хвойных, культивируемые в России. Часть 1. *Juniperus* L., *Cephalotaxus* Sieb. Et Zucc, *Taxus* L., *Toreya* Arn. – Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2009. – 259 с.
3. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону // Биологические мембраны. – 2022. – № 39 (1). – С. 54-62.
4. Bakun P., Czarzynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine // Medicinal Chemistry Research. – 2021. – Vol. 30. – P. 834-84. – [Elektronnyy resurs] – URL: <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02701-0>.
5. Binsch G., Heilbronner E., Jankow R., Schmidt D. On the fluorescence anomaly of azulene // Chem. Phys. Lett. – 1967. – Vol. 1. – P. 135-138.
6. Donaldson L. Autofluorescence in Plants Molecules. – 2020. – Vol. 25 (10). – p. 2393. – [Elektronnyy resurs] – URL: <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>

Статья поступила в редакцию 15.04.2023 г.

Roschina V.V., Soltani G.A., Fateryga V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. Spectral studies of the cell surface to detect azulenes in plants // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2023. – № 147. – P. 90-95

Possible application of spectral research methods for the determination of azulenes on the surface of plant cells promising as pharmacological raw materials has been considered. Leaf surfaces with blue or silver color in *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., *Hippophae rhamnoides* L., needles and cypress cones (berry-cones) *Juniperus excelsa* M. Bieb. and *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A. Schmidt 'Blue Cloud' were investigated. The peaks of 580-620 nm and 660-666 nm characteristic of azulenes and chlorophyll, respectively, have been recorded in the absorption spectra of leaves and cypress cones using a microspectrofluorimeter/ microspectrophotometer. 10 minute extracts from the surface of intact cells with 100% acetone or 95% ethanol have been analyzed to confirm the presence of azulenes in the samples. The content of azulenes in such extracts was in mg/g of wet weight in the leaves of *Eucalyptus cinerea* 12.5 ± 0.02 and *Hippophae rhamnoides* – 1.0 ± 0.1 , and in the needles/cypress cones of juniper *Juniperus excelsa* – $1.76/1.46 \pm 0.3/0.2$ and *Juniperus* × *pfitzeriana* 'Blue Cloud' $0.55/2.96/ \pm 0.01/0.3$, accordingly. All the studied woody plants can be sources of azulenes.

Key words: cell wall; cuticle; absorption; secretory cells; fluorescence