

ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ЮЖНОГО УРАЛА

© 2014 А.В Щербаков¹, И.Ю. Усманов², Я.Т. Суюндуков³

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа

²Уфимский государственный университет экономики и сервиса, г. Уфа

³Институт региональных исследований Республики Башкортостан, Сибай

Поступила 17.10.2013

Представлены данные о внутрипопуляционной пластичности накопления flavonoidов в растениях можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.), солодки Коржинского (*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig.) и тысячелистника великоколепного (*Achillea nobilis* L.) произрастающих на Южном Урале. Проведено сравнение пластичности накопления отдельных flavonoidов у исследованных видов. В работе предполагается, что причиной высокой внутрипопуляционной пластичности накопления flavonoidов является высокая мозаичность содержания в почвах Южного Урала отдельных химических элементов, в первую очередь - двухвалентных катионов. Мозаичность накопления химических элементов в почве в пределах отдельных геохимических провинций обусловлена многоуровневым характером почвенных и климатических событий. В работе высказывается предположение, что на фоне высокой мозаичности почвенных условий и формирования многомерных экологических ниш на Южном Урале значительно возрастает вероятность появления в растениях новых, эндемичных flavonoidных соединений или их отдельных комбинаций. Кроме того, в работе предполагается, что возможной причиной такой высокой пластичности накопления flavonoidов является сетевой стохастический характер функционирования схемы их метаболизма.

Ключевые слова: flavonoidы, ВЭЖХ, динамика накопления, внутрипопуляционная пластичность, Южный Урал.

ВВЕДЕНИЕ

Южный Урал - это уникальный регион, эндемичный по многим почвенным параметрам. Эта эндемичность существенно увеличивается в результате микромозаичного перераспределения химических веществ по элементам ландшафтов. В ходе геологической истории на Южном Урале сформировалось множество местообитаний с уникальными комбинациями химических элементов и хаотичным соотношением концентраций этих элементов [1, 2]. Поскольку элементарный состав почв значительно влияет на накопление растениями различных метаболитов, представляется весьма вероятной высокая пластичность накопления этих соединений в таких мозаичных условиях, в том числе - и в пределах популяционных границ. В полной мере это относится и к биологически активным веществам растений.

Одним из активно изучаемых классов биологически активных веществ растений являются flavonoidы. При этом одной из наиболее актуальных проблем является изучение

влияния на накопление этих соединений различных факторов окружающей среды, в том числе и содержания в почве отдельных элементов [1, 3, 4, 5, 6]. Поэтому чрезвычайно представляется изучение внутрипопуляционных различий в накоплении flavonoidов у лекарственных растений Южного Урала.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами служили образцы надземных частей растений, собранные в пределах единичных популяций можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.), тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.) и солодки Коржинского (*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig) собранные в период с 2005 по 2013 г на территории Баймакского района РБ.

ОЦЕНКА ГЕОХИМИЧЕСКОГО МНОГООБРАЗИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ ЮЖНОГО УРАЛА

Согласно современным представлениям, В Южном Зауралье выделяются три геохимические провинции, различающиеся по составу металлов подпочвенных материнских пород:

1) Юлукско-Тубинская меднорудная расположена в пределах Уралтауского антиклиниория. Для провинции характерно широкое развитие никелевых, медных и кобальтовых геохимических аномалий.

Щербаков Аркадий Владимирович, кандидат биологических наук, доцент; Усманов Искандер Юсуфович, доктор биологических наук, профессор; Суюндуков Ялиль Тухватович, доктор биологических наук, профессор

2) Баймак-Бурибаевская смешанно-менорудная зона, расположена в Западном крыле Магнитогорского мегасинклиниория.

3). Красноуральско-Сибай-Гайская менорудная провинция. В ее пределах находятся два крупнейших менно-колчеданных месторождения - Сибайское и Гайское, а также множество различных по площади и концентрации геохимических аномалий [7,8]

В пределах этих провинций в силу многоуровневого характера почвенных и климатических событий, наблюдается высокая пластичность накопления в почвах отдельных элементов даже в пределах участков небольшой площади. На фоне этого физиологически значимые параметры целого ряда химических элементов меняются в широких пределах. Эти изменения настолько широки, что часто охватывают весь интервал концентраций от дефицита до избытка, в пределах которого возможно функционирование растений.

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ

Сыре сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали до размера частиц 1 – 2 мм, затем фракционировали с использованием растворителей различной полярности следующим способом:

Последовательность экстрагентов : (гексан → диэтиловый эфир → метил-трет-бутиловый эфир → этилацетат → бутанол → 70%-этанол).

В коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл помещали 25 г воздушно-сухого сырья, и приливали 100 мл гексана. Настаивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали через фильтр Шотта с пористостью 100 мкм. Настаивание повторяли еще 2 раза. Объединенный гексановый экстракт упаривали на роторном испарителе.

Аналогично осуществлялась последовательная экстракция диэтиловым эфиром, метил-трет-бутиловым эфиром, этилацетатом, бутанолом и 70%-ным этиловым спиртом. Каждый эксперимент по извлечению экстрактивных веществ проводили трехкратно.

Количество извлеченных экстрактивных веществ определяли весовым методом после удаления растворителя [9].

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Качественное и количественное определение флавоноидов в сухом экстракте лебеды проводили методом ВЭЖХ. Хроматографический анализ проводили на системе Waters Breeze со спектрофотометрическим детектором на длине

волны 254 нм. Определение проводили при градиентном элюировании на колонке Nova-Pak C18 4 мкм, 3,9x300 мм [10]. Количество аналитических повторностей составило 3.

В таблице 1 приведены параметры градиента соотношения растворителей при проведении анализа.

Таблица 1. Параметры градиента растворителей при проведении ВЭЖХ

Время, мин	Вода, %	Ацетонитрил, %
0	90	10
5	90	10
10	80	20
25	50	50
35	90	10
40	90	10

АНАЛИЗ ПЛАСТИЧНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Различия в накоплении растениями отдельных флавоноидов оценивались по следующим показателям:

1) Доли соединений, обнаруженных в индивидуальном растении от общего количества зарегистрированных соединений, %;

2) Отношения «Максимум/минимум» доли соединений, выявленных в отдельных растениях;

3) Коэффициенту осцилляции r . Коэффициент рассчитывался по стандартной формуле:

$$\rho = \frac{R}{\bar{x}}; \text{ где } R = x_{\max} - x_{\min}; \bar{x} - \text{среднее значение показателя [11];}$$

4) Коэффициенту общности Жаккара K_j , рассчитываемому по формуле:

$$K_j = \frac{C}{A + B - C}, \text{ где } A - \text{ количество элементов в первой выборке, } B - \text{ количество элементов во второй выборке, } C - \text{ количество элементов, общих для первой и второй выборок [12].}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Примеры хроматограмм индивидуальных растений трех исследованных видов с указанием пиков, соответствующих отдельным выделенным соединениям, представлены на рисунках 1-3.

Как следует из представленных данных, все исследованные виды отличались высокой пластичностью качественного и количественного состава накапливаемых флавоноидов. Так, установлено, что общее количество флавоноидов, обнаруженных в индивидуальных растениях, в пределах одной популяции может варьировать более, чем в 1,5 раза. У солодки Коржинского

исследованные образцы отличались по количеству выделенных отдельных соединений в 1,6 раза, а у можжевельника казацкого и тысячелистника благородного – в 1,71 и 1,73 раза соответственно. При этом растения Солодки Коржинского характеризуются более стабильным

накоплением отдельных флавоноидов, по сравнению с другими исследованными видами, о чем свидетельствует меньшее значение показателей коэффициента осцилляции и коэффициента Жаккара (таблица 2).

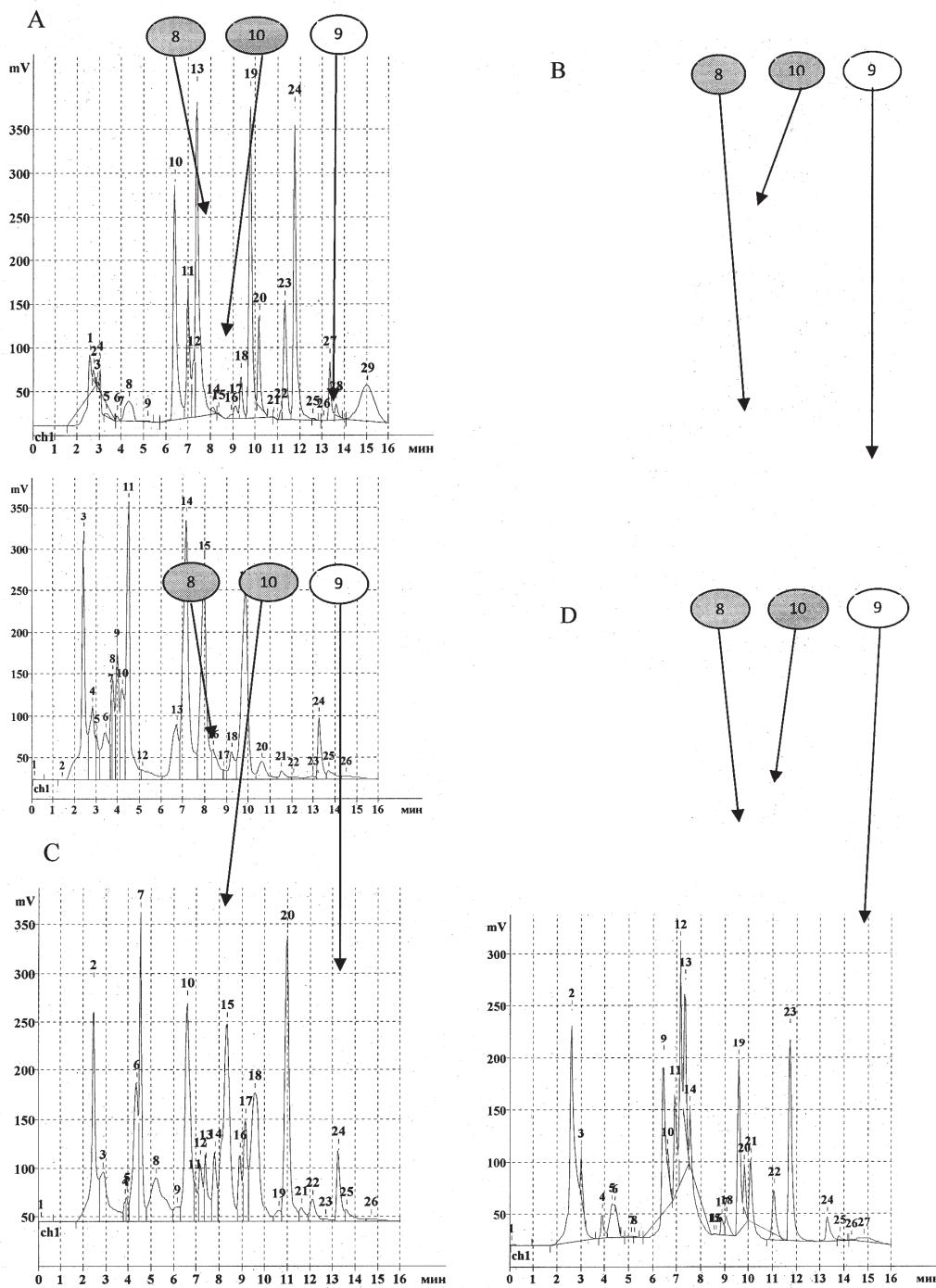


Рис. 1 Внутрипопуляционные различия в растениях *Juniperus sabina*

Все высказанное может свидетельствовать о том что показатели накопление флавоноидов растениями связаны между собой “низкоинформационными” связями, где на каждый из физиологических процессов оказывает

воздействие большое число различных событий, и каждый из этих механизмов обладает достаточной автономностью (тотипотентностью) [13].

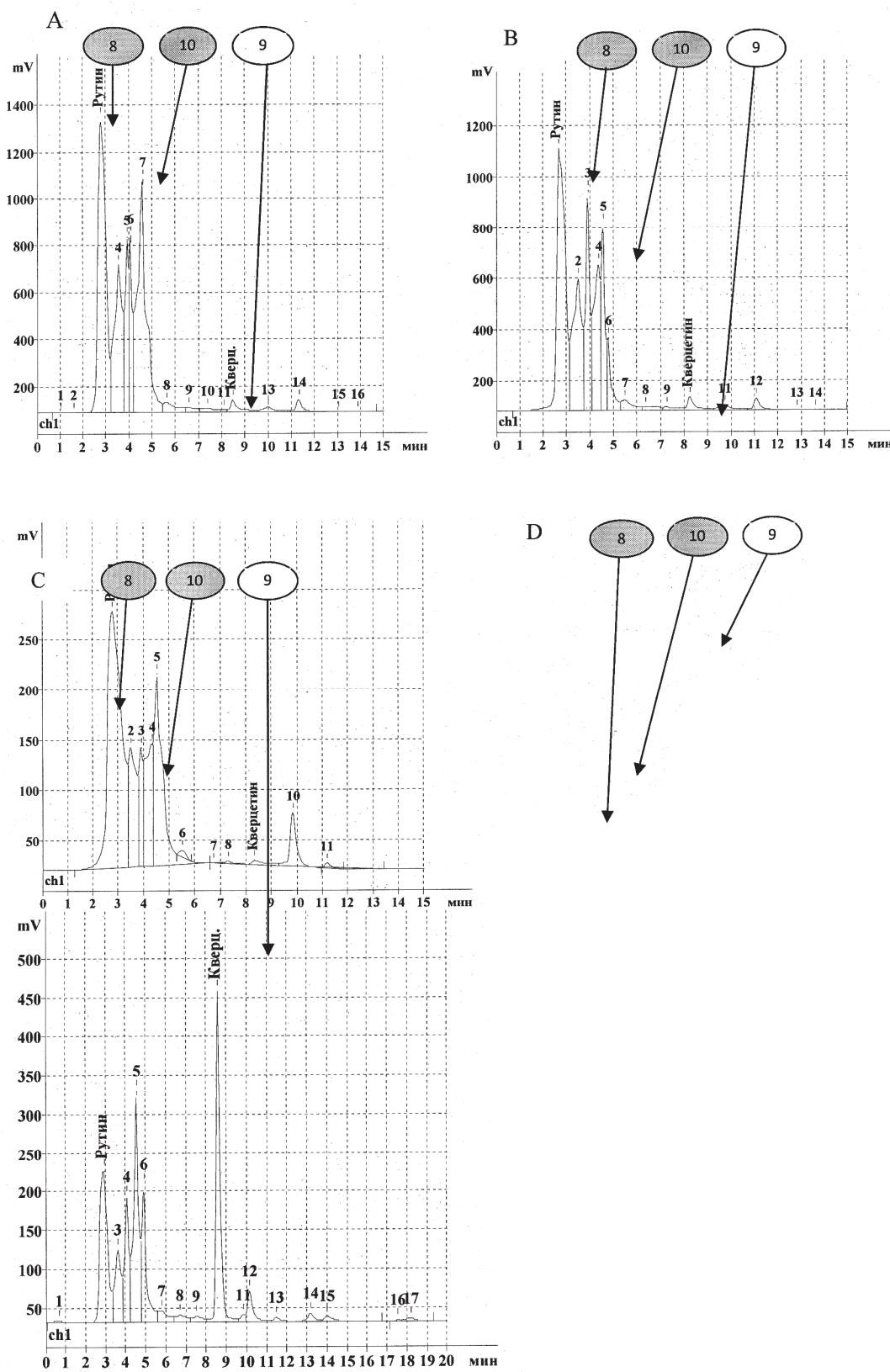


Рис. 2. Внутрипопуляционные различия в растениях *Achillea nobilis*

Отметим, что высокая изменчивость характерна для спектров хроматограмм как по абсолютным показателям (число пиков) так и по относительным показателям (коэффициент

осцилляции, коэффициент Жаккара). Для этих же параметров ранее были выявлены и очень низкие значения коэффициентов корреляции [13, 14].

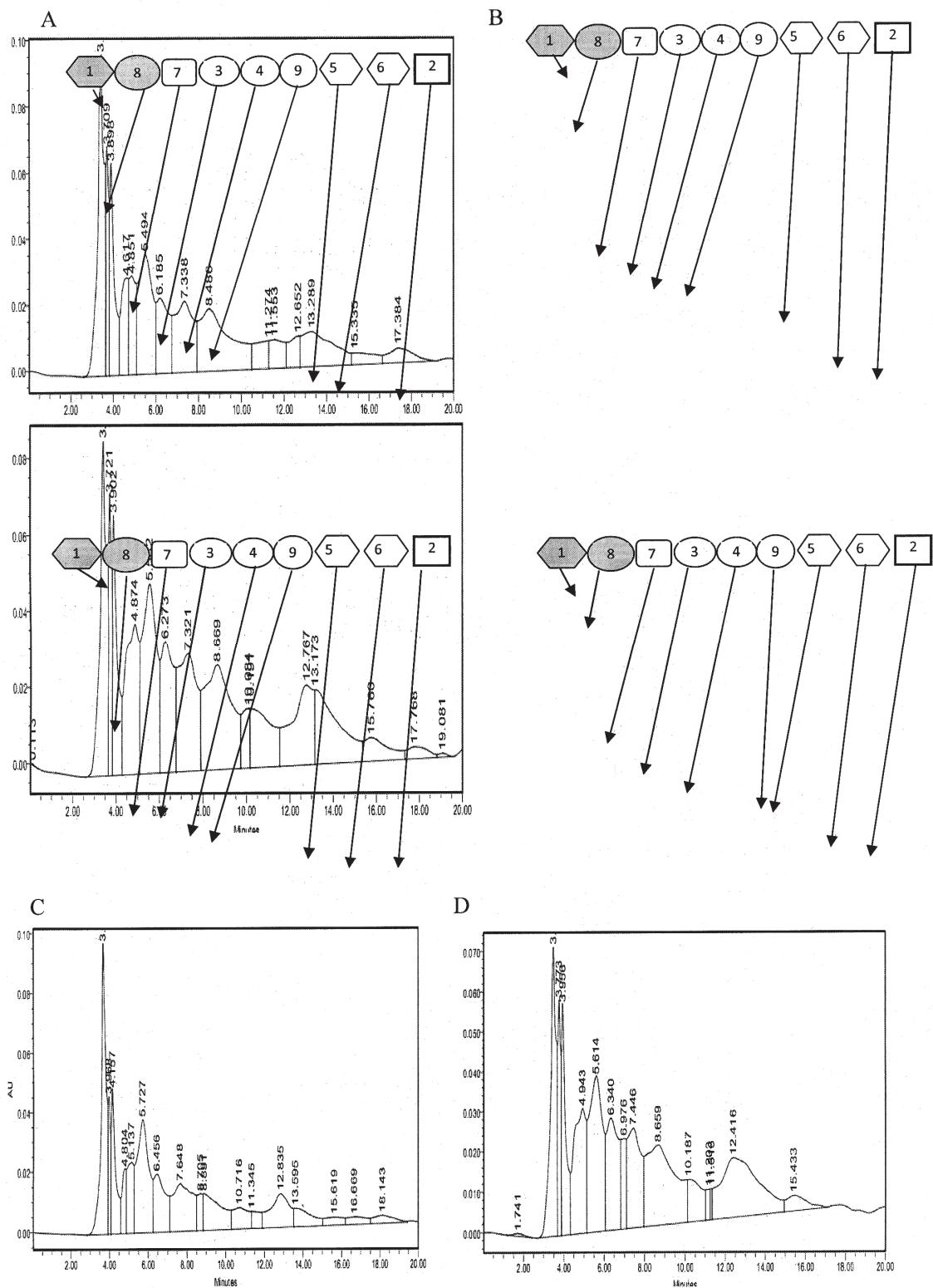


Рис. 3 Внутрипопуляционные различия в растениях *Glycyrrhiza korshinskyi*

Условные обозначения к рисункам 1-3:

А, В, С, Д – индивидуальные растения.

Отдельные вещества:

1-нарингин, 2-байкалеин, 3-физетин, 4-морин, 5-нарингенин, 6-гесперитин, 7-дигидрокверцетин, 8- рутин, 9-кверцетин, 10-изокверцирин

Классы веществ

- флаваноны, - флавоны, - флавонолы, - лейкоантоксианидины

- флаванонолы, - антоцианидины, - агликоны, - гликозиды

Таблица 2. Показатели пластиности состава соединений, выделенных из исследованных видов методом ВЭЖХ

Исследованный вид	Общее колич. выделен. веществ	Число соединений, в индивидуальных растениях		Макс/мин	Коэффициент осцилляции (<i>p</i>)	Коэффициент Жаккара (<i>Kj</i>)
		Минимум	Максимум			
<i>Juniperus Sabina</i>	33	17	29	1.71	0.52	0.57±0,11
<i>Achillea nobilis</i>	22	11	19	1.73	0.54	0,5±0,12
<i>Glycyrrhiza korshinskyi</i>	30	10	16	1.6	0.23	0,41±0,07

Изменчивость общего числа пиков указывает на наличие и функционирование метаболической сети со случайным микрораспределением ингибирующих и стимулирующих воздействий металлов [15]. Это и может наблюдаться через такие показатели, как изменение числа пиков и высокие значения коэффициента осцилляции:

- меняются не одни и те же вещества, что следует из их коэфф. Жакара, который меняется в диапазоне 0,4-0,6 в
- пики, наблюдаемые в каждом конкретном случае слабо коррелируют (возможная причина - пул накопленных флавоноидов либо метаболический, либо экологический)
- высокая изменчивость на фоне низкой взаимосвязи указывает на то, что мы имеем дело с функционированием стохастической децентрализованной адаптивной метаболической сети.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «Генетическое и физиологическое обоснования использования представителей семейства Chenopodiaceae для фитомелиорации засоленных территорий Южного Урала» 12-04-97023-р поволжье а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бускунова Г.Г., Аминева А.А. Мониторинг загрязнения тяжелыми металлами почв Южного Урала и их влияние на лекарственные растения (на примере *Achillea nobilis* L.) // Проблемы биологии, экологии, географии, образования: история и современность. Матер. 2 международ. научн.-практич. конф. (3-5 июня 2008 г.) СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2008. С. 170 – 171.
2. Щербаков А.В., Усманов И.Ю. Биохимический эндемизм лекарственных растений Башкирского Зауралья: механизмы формирования.// XIII Съезд Русского Ботанического Общества (Тольятти, 16-20 сент. 2013 г.). Труды Съезда. Т.3. С.280-281
3. Kupper H. et.al. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense* / Journal of Experimental Botany, 2001, Vol. 52, No. 365, pp. 2291–2300
4. Fernando D.R. et.al. Foliar Mn accumulation in eastern Australian herbarium specimens: prospecting for ‘new’ Mn hyperaccumulators and potential applications in taxonomy / Annals of Botany, 2009, v. 103: pp. 931 –939
5. Щербаков А.В., Чистякова М.В., Усманов И.Ю. Экологические аспекты регуляции пластиности накопления флавоноидов на Южном Урале / Вест. Башкир. гос. ун-та. Изд-во БашГУ, 2011. Т. 16, № 4, С.1198-1205
6. Усманов И.Ю., Семенова И.Н., Щербаков А.В., Суюндуков Я.Т., Усманов Ю.И. Эндемичные экологические ниши Южного (Башкирского) Зауралья: многомерность и флюктуирующие режимы / Вестник БГАУ, 2014 №1. (в печати)
7. Опекунов А.Ю., Опекунова М.Г. Геохимия техногенеза в районе разработки Сибайского медно-колчеданного месторождения // Записки горного института. 2013. Т.203. С. 196 – 204
8. Семенова И.Н., Суюндуков Я.Т., Ильбулова Г.Р. Биологическая активность почв как индикатор их экологического состояния в условиях техногенного загрязнения тяжелыми металлами. Уфа, «Гилем», 2012, 195 с.
9. Коренман И.М. Экстракция в анализе органических веществ. М.: Химия, 2003. 200 с.
10. Косман В.М., Зенкевич И.Г. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы, флаваноны и их гликозиды // Раствительные ресурсы. 1997, Т. 33 №2 С. 14-26.
11. Шмойлова Р.А. Общая теория статистики: Учебник.М.: Финансы и статистика, 2002. 256 с.
12. Миркин Б.М., Розенберг Г.С., Наумова Л.Г. Словарь понятий и терминов современной фитоценологии. М.: Наука, 1989. 223 с.
13. Щербаков А.В. Пластиность корреляционных связей между показателями основного и специализированного метаболизма растений как ответная реакция на непредсказуемость среды обитания./ Изв. Самар. НЦ РАН. 2013. Т. 15, №3 (1) С. 106-111.
14. Щербаков А.В., Чистякова М.В., Усманов И.Ю. Экологические аспекты регуляции пластиности накопления флавоноидов на Южном Урале / Вест. Башкир. гос. ун-та. 2011. Т 16, № 4, С.1198-1205
15. Усманов И.Ю., Семенова И.Н., Щербаков А.В., Суюндуков Я.Т., Усманов Ю.И. Эндемичные экологические ниши Южного (Башкирского) Зауралья: многомерность и флюктуирующие режимы // Вестник БГАУ, Уфа, 2014 №1.

INTRAPOPULATION VARIABILITY OF FLAVONOID BIOSYNTHESIS IN MEDICINAL PLANTS OF SOUTH URALS

© 2014 A.V. Scherbakov¹, I.Yu. Usmanov², Y.T. Suyundukov³

¹ Bashkir state university, Ufa

² The Ufa State Academy of economy and service, Ufa

³ Institute for Regional Studies of the Republic of Bashkortostan, Sibai

The data on the intra-population plasticity accumulation of flavonoids in plants Cossack juniper (*Juniperus sabina* L.), Korzhinsky licorice (*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig.) and yarrow gorgeous (*Achillea nobilis* L.) which is grown in the southern Urals is present. A comparison was made of individual plasticity accumulation of flavonoids in the studied species. In this paper it is assumed that the cause of high plasticity intrapopulational accumulation of flavonoids is high mosaic content in soils of the Southern Urals separate chemical elements. First of all it refers to a divalent cation, which content in the soils of the region varies in a very wide range and can be successfully considered as an endemic, because it is very different from the average Clark levels for the Earth lithosphere. Mosaic accumulation of chemical elements in the soil within the individual geochemical provinces is due to the multilevel nature of the soil and climatic events. The paper suggests that, given the high patchiness of soil conditions and the formation of multi-dimensional ecological niches in the Southern Urals significantly increases the probability of occurrence in plants new endemic flavonoid compounds or certain combinations. Furthermore, the work is assumed that a possible cause of such a high plasticity of flavonoids accumulation is the stochastic nature of the network pathway system of flavonoids metabolism.

Key words: flavonoids, HPLC, accumulation dynamics, intrapopulational plasticity, Southern Urals.