

На правах рукописи



Третьяков Михаил Юрьевич

МОРФО-АНАТОМИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE DUMORT.
В УСЛОВИЯХ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

03.00.05 – ботаника

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Саратов 2009

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный университет» на кафедре ботаники и методики преподавания биологии

Научные руководители: доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
Сорокопудов Владимир Николаевич

доктор химических наук, доцент, Дейнека
Виктор Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
Коннова Светлана Анатольевна

доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
Маланкина Елена Львовна

Ведущая организация Белгородский филиал Государственного
учреждения Всероссийского научно-
исследовательского института лекарственных
и ароматических растений (ВИЛАР)

Защита состоится «5» февраля 2009 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, E-mail: biosovet@sgu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан «19» декабря 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



С.А. Невский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Первые сведения о растительном покрове Белгородской области появились в конце XVIII столетия (Зуев, 1787). В настоящее время флора Белгородской области насчитывает от 1167 (Еленевский и др., 2004) до 1457 (Колчанов, 1995) видов. Охватить все это разнообразие достаточно трудно, однако изучение отдельных семейств наиболее перспективно, так как позволяет в короткие сроки собрать достаточно информации обо всех или почти всех представителях, произрастающих на территории области. Именно такие данные являются основой флористических исследований флоры области в целом (Полуянов, 2005).

Сложноцветные – самое крупное семейство двудольных растений. В нем от 1250 до 1300 родов и более 25 000 видов (Яковлев и др., 1997). Особый интерес представляют некоторые представители этого семейства в связи с их практической значимостью как возможные источники биологически активных веществ. В частности растения рода *Tagetes* L. (бархатцы) накапливают в цветках беспрецедентно высокое количество лютеина, что делает их главным промышленным источником этого ксантофилла (Bosma et al., 2003; Rodriguez-Campana et al., 2006). Многочисленные исследования свидетельствуют о связи между поступлением лютеина в организм человека, увеличением плотности макулярного пигмента и снижением риска развития возрастной макулярной дегенерации (ВМД) (Snodderly et al., 1984; Bone et al., 1988; Seddon et al., 1994; Hammond et al., 1997; Landrum et al., 1997; Sommerburg et al., 1998; Mohammedshah et al., 1999; Beatty et al., 2001; Johnson, 2002). Однако бархатцы во всех частях растения накапливают полициклофены, токсичные по отношению к некоторым грибам и нематодам (Mukundan et al., 1991) и вызывающие контактный дерматит у человека (Towers et al., 1979), поэтому очистка ксантофиллов от тиофенов является необходимым условием получения чистых препаратов.

Ряд высокодекоративных сортов бархатцев отклоненных (*T. patula* L.) имеют цветки с темно-вишневыми пятнами, наличие которых связано с биосинтезом антоцианов. Однако никаких упоминаний об исследовании этих пигментов и их влиянии на накопление ксантофиллов при совместном присутствии в лепестках цветков антоцианов и каротиноидов в литературе нами обнаружено не было. Важность этого вопроса связана с тем, что антоцианы существуют в кислой среде, в то время как в кислых средах каротиноиды не отличаются устойчивостью.

Бархатцы, несмотря на достаточно высокую перспективность, не дают в нашем регионе самосева и не содержат в достаточном (для поддержания сохранности макулы) количестве производных зеаксантина. Поэтому поиск других источников ксантофиллов и других биологически активных веществ во флоре Белгородской области, в том числе и среди дикорастущих и культивируемых представителей семейства *Asteraceae* является важной и актуальной задачей.

Цель исследования. Выявление морфо-анатомических и биохимических особенностей некоторых представителей семейства *Asteraceae* в условиях Белгородской области.

Задачи исследования:

1. Уточнить видовой состав и ареалы представителей семейства Asteraceae по территории Белгородской области.

2. Провести анализ жизненных форм семейства Asteraceae.

3. Поиск биологически активных веществ (ксантофиллов и тиофенов) в дикорастущих и культивируемых растениях семейства Asteraceae.

4. Выявить морфо-анатомические особенности репродуктивных органов рода *Tagetes* в условиях Белгородской области, связанные с накоплением ксантофиллов.

5. Исследовать особенности биосинтеза ксантофиллов и антоцианов в лепестках цветков некоторых видов и сортов растений рода *Tagetes*.

Научная новизна. Выявлены новые места произрастания ряда видов семейства Asteraceae на территории Белгородской области, проведен анализ их жизненных форм. Изучены морфо-анатомические особенности репродуктивных органов рода *Tagetes*, определены особенности локализации и накопления пигментов. Впервые исследованы интенсивность и особенности биосинтеза ксантофиллов в лепестках некоторых видов и сортов растений рода *Tagetes* в условиях Белгородской области. Установлены особенности биосинтеза для цветков различной окраски. Выявлены сорта рода *Tagetes*, содержащие значительное количество ксантофиллов (лютеина), которые можно рекомендовать для промышленного выращивания в условиях Белгородской области. Впервые выполнено исследование совместного биосинтеза ксантофиллов и антоцианов в цветках некоторых сортов вида *T. patula* L. и политиофенов в различных частях растений рода *Tagetes* в условиях Белгорода. Проведен поиск источников ксантофиллов и политиофенов в некоторых культурных и дикорастущих растениях семейства Asteraceae. Установлена потенциальная возможность выращивания *Tagetes erecta* L., *Cosmos sulphureus* Cav. для промышленного получения лютеина и *Tagetes* ssp. и *Echinops sphaerocephalus* L. как источника политиофенов.

Практическая ценность работы. Результаты работы могут применяться в природоохранной деятельности для сохранения мест произрастания редких и исчезающих видов семейства Asteraceae, включенных в Красные книги России и Красную книгу Белгородской области, а также позволяют уточнить биологические запасы и расширить представления о распространении изученных видов. Материалы по содержанию ксантофиллов в цветках рода *Tagetes* представляют практический интерес, так как позволяют рекомендовать перспективные сорта для получения сырья для фармации. Получены данные по сезонной динамике накопления ксантофиллов и биопродуктивности разных видов рода *Tagetes*, необходимые для внедрения промышленной технологии выращивания этих растений. Найден источник зеаксантина (*Physalis alkekengi* L.), позволяющий дополнить комплекс ксантофиллов до необходимого для здоровья человека соотношения лютеин : зеаксантин (4:1), что позволило создать эффективную кормовую добавку для птицеводства. Предложенные методы очистки ксантофиллов от политиофенов повысят качество получаемой продукции.

Получено положительное решение № 207113094 по заявке на получение патента РФ «Биологически активная добавка для кур и способ ее получения», который был награжден серебряной медалью на VIII Московском международном салоне инноваций и инвестиций в 2008 г. Опыты по использованию добавки подтвердили ее эффективность – уровень накопления кантофиллов в желтке яиц повышался в 2 – 2,5 раза.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы были представлены на: II Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2005); Международной научно-практической конференции (Белгород, 2006); IV Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2006); I (IX) Международной Конференции Молодых Ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2006); Международной научно-практической конференции: «Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования». VII Международный симпозиум, Материалы научной конференции «Флора и растительность Центрального Черноземья» (Курск, 2007; 2008), чтениях, посвященных 300-летию со дня рождения К. Линнея (Луганск, 2007), Международной научной конференции «Современные проблемы интродукции и сохранения биоразнообразия растений» (Воронеж, 2007), Материалы 2-й международной научно-практической конференции «Наука и устойчивое развитие общества. Наследие В.И. Вернадского» (Тамбов, 2007), Международной научно-практической конференции посвященной Дню Российской науки «Лекарственные растения и биологически активные вещества: фитотерапия, фармация, фармакология» (Белгород, 2008), V Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар-Уфа, 2008), Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы региональных ботанических исследований» (Воронеж, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ, две из которых в изданиях перечня ВАК РФ, заявка на изобретение и две коллективные монографии «Красная книга Белгородской области» и «Дикорастущие лекарственные растения Белгородской области (ареал, биология, химический состав, препараты, применение)».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы и приложения. Общий объем работы составляет 200 страниц, содержит 9 таблиц и 56 рисунков. Список литературы включает 248 источников отечественных и зарубежных авторов. В приложении приведен список дикорастущих видов семейства Asteraceae во флоре Белгородской области с морфологическим описанием.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее эффективными из исследованных растений семейства Asteraceae по накоплению лютеина являются *Cosmos sulphureus* Cav. и виды *Tagetes patula* L., *Tagetes erecta* L. с оранжевой окраской цветков.

2. В условиях г. Белгорода наивысшее накопление ксантофиллов в лепестках цветков найдено для сортов *Tagetes erecta* L. «Сиера оранжевый» и «Родос».

3. *Tagetes* spp накапливают тиофены во всех частях растения, включая лепестки цветков; наивысшее накопление тиофенов происходит в боковых корнях и коре главного корня *Tagetes* и *Echinops sphaerocephalus* L.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обозначены актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость исследования, сведения об апробации работы и основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ВО ФЛОРЕ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE (обзор литературы)

В главе дается обзор литературных данных по исследованию семейства Asteraceae во флоре Белгородской области. Приведена краткая биологическая характеристика семейства Asteraceae, дано описание некоторых биологически активных веществ (ксантофиллов и политиофенов), встречающихся у представителей этого семейства, анализируется их применение в медицине и сельском хозяйстве.

Глава 2. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Дана характеристика природно-климатических условий Белгородской области: рельефа, климата, почвы, погодных условий в годы проведения исследований. Рассмотрено современное состояние растительности.

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Флористическая часть работы выполнена традиционным маршрутно-флористическим методом (Алехин и др., 1926) в течение 2003-2008 гг. Кроме собственных сборов, были изучены гербарные образцы, хранящиеся в коллекциях участка «Лес на Ворскле» заповедника «Белогорье» (WORSKL), в гербарных фондах Белгородского государственного университета (BSU), а также опубликованные работы по флоре области за последние четыре года. При установлении видовой принадлежности собранных экземпляров был использован морфолого-географический метод, основанный на исследовании морфологических признаков гербарных экземпляров и растений в природе. Номенклатура таксонов выверена по П.Ф. Маевскому (2006).

При определении жизненных форм растений использовали системы К. Раункиера (1934), И.Г. Серебрякова (1962, 1964), а также собственные наблюдения автора (Миркин и др., 2002).

Для определения влияния условий произрастания на рост и развитие *Tagetes* выполнен морфометрический анализ, в качестве биометрической характеристики использовали следующие параметры: количество соцветий (b), масса соцветий и цветков (m и m_1 соответственно), высота стебля (h) (Моисейченко и др., 1996). Анатомическое изучение структуры лепестков цветков проводили по методике Н.М. Паушевой (1988).

Образцы цветков и корней для биохимического анализа собирали в течение вегетационного периода растений 2006-2008 гг. в ботаническом саду БелГУ и некоторых районах Белгорода и области.

Количественное и качественное определение биологически активных веществ проводили в жидких экстрактах с использованием методов спектрофотометрии, тонкослойной, нормально-фазовой и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ГЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Очистка ксантофиллов от тиофенов проводилась методом флэш-хроматографии в нормально-фазовом и обращенно-фазовом вариантах на концентрирующих патронах ДИАПАК. Спектры в УФ и видимой области электромагнитного спектра записывали на приборе КФК-3-01 с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 0,1; 0,3 и 1 см.

Хроматографические исследования проводили на хроматографе фирмы «Gilson» со спектрофотометрическим и рефрактометрическим детекторами, с использованием насосов Altech 110A или Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятым методом с определением среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала (Моисейченко и др., 1996). Для обработки результатов использовали программный продукт Microsoft Office Excel 2003.

Глава 4. СЕМЕЙСТВО ASTERACEAE (COMPOSITAE) DUMORT. ВО ФЛОРЕ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

К настоящему моменту на территории Белгородской области зарегистрировано 56 родов и 197 видов растений семейства Asteraceae (Compositae). В Красную книгу Белгородской области занесены 12 видов, имеющих следующие категорию и статус: редкие виды III – *Senecio schvetzovii* Korsh. (*S. doria* L. ssp. *doria*), *Centaurea orientalis* L., *Centaurea ruthenica* Lam., *Artemisia santonica* L. (*A. cretacea* Kotov, *A. lerchiana* Web. ex Stechm. *A. monogyna* Waldst. et Kit., *A. nutans* Willd.), *Artemisia salsoloides* Willd. (последний вид занесен в основной список Красной книги Российской Федерации); – неизученные виды (неопределенный статус) IV – *Antennaria dioica* (L.) Gaertn., *Xeranthemum annum* L., *Centaurea taliewii* Kleop., *Centaurea pineticola* Hjin (последние два вида занесены в основной список Красной книги Российской Федерации); – уязвимые виды V – *Scorzonera purpurea* L., *Galatella villosa* (L.) Reichenb. [*Aster oleifolius* (Lam.) Wagenitz; *Linosyris villosa* (L.) DC.;

Crinitaria villosa (L.) Cass.]; – особо ценные виды VI – *Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess. (занесена в основной список Красной книги Российской Федерации).

К кандидатам на включение в Красную книгу Белгородской области относятся 15 видов: *Artemisia armeniaca* Lam., *Artemisia pontica* L., *Centaurea carbonata* Klok., *Centaurea majorovii* Dumb., *Chondrilla graminea* Bieb., *Crepis paludosa* (L.) Moench, *Crepis pannonica* (Jack.) C. Koch (*C. rigida* Waldst. et Kit.), *Echinops ritro* L. [*E. ruthenicus* Bieb., *E. meyeri* (DC.) Iljin], *Galatella angustissima* (Tausch) Novopokr. (*A. angustissimus* Tausch), *Galatella linosyris* (L.) Reichenb. fil. [*Aster linosyris* Bernh., *Linosyris vulgaris* Cass. ex Less.; *Crinitaria linosyris* Less.], *Lactuca saligna* L., *Scorzonera austriaca* Willd., *Scorzonera ensifolia* Bieb., *Senecio paucifolius* S. G. Gmel. [*S. kirghisicus* DC., *S. racemosus* (Bieb.) DC., *S. doria* L. ssp. *kirghisicus* (DC.) Chater], *Taraxacum bessarabicum* (Hornem.) Hand-Mazz.

Впервые для Белгородской области отмечены следующие 8 видов: *Achillea micrantha* Willd., *Ambrosia trifida* L., *Anthemis arvensis* L., *Chartolepis glastifolia* (L.) Cass. (*Ch. intermedia* Boiss.; *Centaurea glastifolia* L.), *Jurinea ewersmanii* Buge, *Jurinea multiflora* (L.) B. Fedtsch., *Pilosella x floribunda* (Wimm. et Grab.) Fries [*P. lactucella* x *P. onegensis* > *P. praealta* >> *P. officinarum*; *Hieracium floribundum* Wimm. et Grab., *H. sueticium* Fries], *Tanacetum millefolium* (L.) Tzvel.

К видам, исчезнувшим и нахождение которых вызывает сомнение на территории области, относятся 7 представителей: *Achillea ptarmica* L. (*Ptarnica vulgaris* Blakw. ex DC.), *Centaurea trinervia* Steph., *Crepis praemorsa* Tausch., *Gnaphalium sylvaticum* L. [*Omalotheca sylvatica* (L.) Sch. Bip. et F. W. Schultz], *Pilosella x collina* (Goschn.) Sojak (*Hieracium collinum* Gochn., *H. fallax* Willd.), *Tragopogon pratensis* L., *Xanthium strumarium* L.

К культивируемым на территории Белгородской области относится 32 вида, однако это далеко не все, а только лишь те, которые получили широкое распространение. Также в список не внесены произрастающие на территории области дикорастущие (адвентивные) и окультуренные виды, формы которых широко распространены, например, *Astra*, *Centaurea*, *Tanacetum* и др.

Преобладающими среди растений семейства Asteraceae биоморфами по К. Раункьеру на территории Белгородской области являются гемикриптофиты – 58,88%, на долю криптофитов и терофитов приходится по 21,83% и 16,75% соответственно, незначительную долю от общего числа составляет процент хамефитов – 2,54%. Такое соотношение биоморф свидетельствует о приближении к биологическому спектру растений умеренно холодной зоны.

Изучение жизненных форм семейства Asteraceae по И.Г. Серебрякову свидетельствует о том, что наибольшее количество видов – 58,38% приходится на травянистые поликарпики, которым значительно уступают монокарпики – 39,59% и совсем мала доля полукустарников и полукустарничков – 0,51% и 1,52% соответственно. Среди поликарпиков выделены корневищные – 66,96%, стержнекорневые – 24,35% и внесшие незначительный вклад корнеотпрысковые и клубневые – по 6,96% и 1,74%. Такое соотношение биоморф характерно в условиях фонового влияния аборигенных видов и умеренной антропогенной нагрузке.

По продолжительности жизненного цикла на первое место выходят многолетники – 64,97%, что свидетельствует о преобладании степных типов сообществ. Однолетники и двулетники составляют по – 15,23% и 12,69%

соответственно, а одно- двулетники всего 7,11%. Такие значения отчасти объясняются наличием адвентивных и синантропных видов.

На долю безрозеточных приходится 54,92%, полурозеточных – 38,34%, а розеточные составляют лишь 6,74% от общего количества видов. Такой характер распределения в спектре жизненных форм характерен для сообществ, формирующихся в условиях степной зоны.

Глава 5. ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НЕКОТОРЫМИ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE

В ходе выполнения флористической части работы определен новый самостоятельный аспект – поиск растений семейства Asteraceae белгородской флоры, которые можно рассматривать, как перспективные источники ксантофиллов.

В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях Белгородской области наиболее интенсивный биосинтез ксантофиллов осуществляется в цветках рода *Tagetes*, которому уступает *Cosmos sulphureus* Cav. В остальных исследованных цветках растений семейства Asteraceae (*Achillea tomentosa* L., *Anthemis tinctoria* L., *Calendula officinalis* L., *Gazania x hybrida* hort., *Helianthus annuus* L., *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Inula britannica* L., *Inula ensifolia* L., *Inula helenium* L., *Inula salicina* L., *Lactuca serriola* L., *Senecio erucifolius* L., *Solidago canadensis* L., *Sonchus asper* (L.) Hill., *Sonchus oleraceus* L., *Taraxacum officinalis* L.) биосинтез ксантофиллов не останавливается на стадии образования лютеина и идет вплоть до образования продуктов эпексидирования.

Анатомическое изучение особенностей накопления ксантофиллов в цветках *T. erecta* L. показало, что диэфиры лютеина накапливаются в хромопластах, имеющих шарообразную форму. Хромопласты присутствуют во всех клетках мезофилла, но концентрируются в основном в эпидермальных, рис. 1-2.

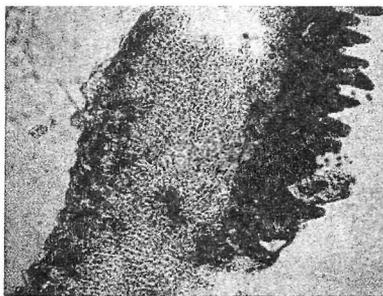


Рис. 1. Поперечный срез лепестков цветков *T. erecta* L. 10/0,25 x 10/18

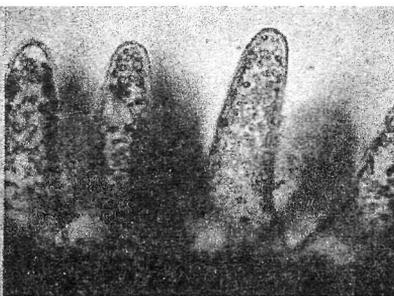


Рис. 2. Сосочковые клетки верхнего эпидермиса с хромопластами лепестков *T. erecta* L. 40/0,065 x 10/18

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что синтез ксантофиллов возрастает при увеличении их степени этерификации (Damaso Romero-Mendez et al., 2000). Так ксантофиллы цветков бледно-желтой окраски представлены незфирными фракциями, а цветки с интенсивной темно-оранжевой окраской накапливают в основном диэфир, рис. 3, таблица 1.

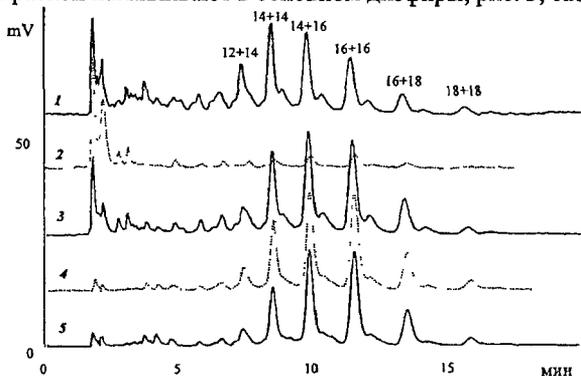


Рис. 3. Бархатцы тонколистные (1); Б. прямостоящие: желтые (2), абрикосовые (3), светло-оранжевые (4), оранжевые (5) 250*4 мм Кромасил-С18, 5 мкм; 10 об.% ацетонитрила в ацетоне; 445 нм.

Таблица 1

Жирнокислотный состав диэфирной фракции ксантофиллов

Вид	<i>Tagetes tenuifolia</i> L.	<i>Tagetes erecta</i> L.			
	Желто-оранж.	Оранже.	Светло-оранж.	Абрик.	Лим-желт.
Окраска лепестков	Желто-оранж.	Оранже.	Светло-оранж.	Абрик.	Лим-желт.
Моль доля диэфиров <i>транс</i> -лютеина в сумме каротиноидов, %					
Сумма	58.8	79.9	83.7	61.6	< 30%
Моль доля индивидуальных диэфиров в сумме диэфиров <i>транс</i> -лютеина, %					
дилаурат (12+12)	1.3	0.9	0.5	0.8	< 0,1
лаурат-миристиат (12+14)	12.7	6.3	5.5	5.6	< 0,1
димристиат (14+14), (12+16)	27.6	18.3	18.7	22.4	< 0,1
миристиат-пальмитат (14+16), (12+18)	27.2	28.4	30.5	28.6	< 0,1
дипальмитат (16+16), (14+18)	19.2	30.2	29.1	28.1	< 0,1
пальмитат-стеарат (16+18)	8.1	12.5	12.2	12.0	< 0,1
дистеарат (18+18)	3.9	3.2	3.5	2.5	< 0,1

Следовательно, с технологической точки зрения (для увеличения выхода лютеина), следует выбирать сорта с интенсивной оранжевой окраской цветков. Высокая степень этерификации характерна и для лютеина, накапливаемого в лепестках цветков *C. sulphureus* Cav., но с отличающимся от бархатцев жирнокислотным составом – 69,6 % радикалов миристиновой и 30,4 % – пальмитиновой кислот.

Принципиальных отличий между составом ксантофиллов исследованных сортов обнаружено не было. Основным ксантофиллом в цветках бархатцев был

полностью *транс*-лютеин (в виде диэфиров). Минорные пики на рис. 3 соответствуют *цис*-формам диэфиров лютеина и диэфирам зеаксантина, который, наряду с лютеином, необходим для профилактики и лечения ВМД.

При выращивании в условиях Белгородской области уровень биосинтеза ксантофиллов сопоставим с такими же показателями для других регионов мира, для сортов двух видов бархатцев: *T. patula* L. и *T. erecta* L. рис. 4.

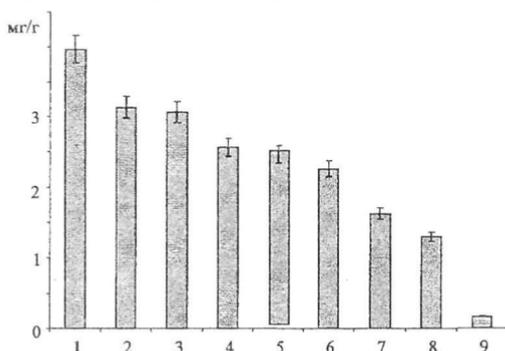


Рис. 4. Содержание ксантофиллов (в пересчете на лютеин) в свежих лепестках цветков различных сортов бархатцев

На рис. 4 представлены данные о бархатцах, выращенных в сезоне 2006 г. сорта: 1 – Сиера оранжевый (*T. erecta* L.), 2 – Родос (*T. erecta* L.), 3 – Оранжевый снег (*T. erecta* L.), 4 – Оранжевое пламя – краевые цветки (окрашены антоцианами) (*T. patula* L.), 5 – Коландо абрикосовый (*T. erecta* L.), 6 – Оранжевое пламя – центральные оранжевые цветки (*T. patula* L.), 7 – Оранжевое пламя махровые (*T. patula* L.), 8 – Гармония – цветки с различной интенсивностью окраски на одном соцветии (среднее содержание) (*T. patula* L.), 9 – Лимонные (*T. erecta* L.). Наивысшее накопление ксантофиллов было найдено для сортов видов *T. patula* L. и *T. erecta* L. с оранжевой окраской цветков – порядка 3-4 мг/г свежих лепестков. При переходе к сортам с желтой и особенно лимонно-желтой окраской уровень содержания ксантофиллов снижался более чем на порядок, оставляя за ними лишь декоративную ценность. При сохранении оранжевой окраски содержание ксантофиллов было выше у сортов *T. erecta* L.

В 2006 – 2008 гг. была проведена комплексная оценка по урожайности цветков двух видов *T. erecta* L. и *T. patula* L. Выбор именно этих двух видов был связан с тем, что размеры цветков *T. tenuifolia* L. настолько малы, что не представляют технологического интереса. Несмотря на более высокое содержание лютеина в цветках *T. erecta* L., урожайность определялась не только степенью накопления ксантофиллов, но и густотой посева, количеством соцветий на одно растение и массой цветков. Биопродуктивность *T. erecta* L. «Сиера оранжевый» и *T. patula* L. «Мандарин» и некоторые морфологические показатели за вегетационный период 2006-2008 гг. представлены в таблице 2.

Таблица 2

Урожайность цветков и некоторые морфологические показатели *Tagetes*

Вид	N_L , шт.	h, см	n, шт.	m, г	m^* , г	$\Sigma m^*/L$, г/м	$M(lu)/L$, г/м
Сезон 2006 г.							
Сиера оранжевый	34,5 ± 10,0	61,3 ± 5,42	4,64 ± 2,05	9,67 ± 0,78	4,93 ± 0,63	790	3,1
Мандарин	30,6 ± 12,5	29,03 ± 11,76	32,5 ± 9,91	2,37 ± 0,22	1,61 ± 0,2	1600	3,6
Сезон 2007 г.							
Сиера оранжевый	24,16 ± 7,69	76,87 ± 13,23	3,77 ± 1,3	12,27 ± 1,25	6,32 ± 0,88	580	1,9
Мандарин	30,68 ± 7,30	40,25 ± 5,96	24,0 ± 11,88	2,57 ± 0,4	1,36 ± 0,24	1000	2,2
Сезон 2008 г.							
Сиера оранжевый	69,89 ± 17,49	59,20 ± 4,45	2,67 ± 1,23	7,02 ± 0,67	3,34 ± 0,4	620	2,6
Мандарин	49,31 ± 7,05	27,15 ± 3,16	11,71 ± 5,04	1,61 ± 0,15	0,62 ± 0,09	360	1,1

N_L – количество растений на 1 погонный метр, шт; h – высота растения, см;

n – количество соцветий на одном растении; m – масса соцветия, г;

m^* – масса цветков в соцветии, г; $\Sigma m^*/L$ – продуктивность вида по свежим лепесткам, г/м;

$\Sigma M(lu)/L$ – продуктивность по лютеину, г на 1 погонный метр

На цветки приходится 50 – 60% от массы соцветий у видов *T. erecta* L. и *T. patula* L., причем «полезная масса» в случае цветков первого вида в 5 – 6 раз больше. При сушке цветков в сухом и прохладном месте без доступа света в течение недели масса цветков существенно уменьшается и составляет для *T. erecta* L. 14-17% от массы влажных и 23% для вида *T. patula* L.

Динамика накопления диэфиров лютеина в цветках *T. erecta* L. сортов «Сиера оранжевый» и «Коландо абрикосовый» и *T. patula* L. сорта «Мандарин» за 2008 год представлена на рис 5.

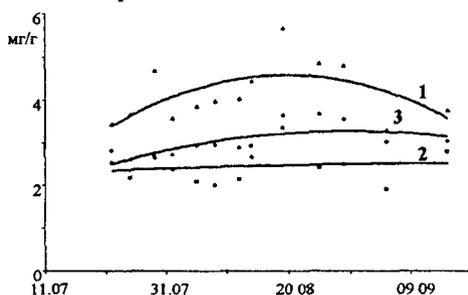


Рис. 5. Накопление ксантофиллов в лепестках цветков двух видов бархатцев (2008 г.), сорта: 1 – Сиера оранжевый (*T. erecta* L.) (*); 2 – Коландо абрикосовый (*T. erecta* L.) (*); 3 – Мандарин (*T. patula* L.) (*)

Динамика накопления свидетельствует о снижении содержания ксантофиллов к концу сентября, что может быть связано с обычным в этот период для Белгородского региона снижением средней суточной температуры. Некоторое варьирование концентрации ксантофиллов в течение цветения растений связано с изменением количества влаги в лепестках. Достаточно стабильное содержание ксантофиллов в лепестках цветков растений рода *Tagetes* позволяет осуществлять сбор соцветий с начала цветения до первых заморозков. Оптимальным сроком является середина августа, так как в этот период высок процент цветущих растений и содержание диэфиров лютеина находится на высоком уровне.

Проведенные исследования позволяют рекомендовать для промышленного использования в условиях Белгородской области сорта, цветки которых наиболее интенсивно окрашены в оранжевый цвет. В нашем случае это сорта – «Сiera оранжевый», «Родос» и «Оранжевый снег». Несмотря на то, что урожайность цветков *T. patula* L. выше (исключением стал 2008 год, наиболее засушливый), более предпочтительными для выращивания в условиях Белгородской области в промышленных масштабах является *T. erecta* L. Это связано с тем, что технологически выгоднее убирать более крупные соцветия, которые зацветают на одном растении практически одновременно, в отличие от *T. patula* L., цветение которого сильно растянуто. Отметим, что высокая густота посева в 2008 г. привела к снижению биопродуктивности для обоих видов, что связано с уменьшением площади питания, а засушливые условия лета позволили *T. erecta* L. увеличить урожайность за счет более развитой корневой системы.

Для увеличения биопродуктивности необходимо рекомендовать сорта с более плотными соцветиями, что позволит получить более высокий процент цветков от массы соцветий. Исходя из вышеуказанных соображений, из всех исследованных сортов наибольшей урожайностью соцветий и содержанием диэфиров лютеина выделяется сорт *T. erecta* L. «Сiera оранжевый», который необходимо рекомендовать для промышленного выращивания в условиях Белгородской области.

Для решения проблемы повышения доли зеаксантина в цветках известно получение мутантов с измененным биосинтезом ксантофиллов, альтернативой этому может быть использование других растений, которые могут быть источниками зеаксантина. Среди растений семейства Asteraceae таких источников нами найдено не было и в качестве поставщика зеаксантина был предложен физалис декоративный *Physalis alkekengi* L. (Solanaceae), который может с успехом быть использован в условиях Белгорода.

Отличительной особенностью *T. patula* L. (и *T. tenuifolia* L.) по сравнению с *T. erecta* L. является накопление в цветках не только ксантофиллов, но и антоцианов, обеспечивающих появление пятен темно-вишневого цвета. Несмотря на то, что одновременный биосинтез каротиноидов и антоцианов характерен для целого ряда растений, необычность этого явления связана с тем, что каротиноиды чувствительны к кислой среде, необходимой для существования антоцианов, т.е. аккумуляция этих пигментов должна происходить в разных частях клетки.

На рис. 6-7 представлены фотографии поперечных срезов лепестков цветков *T. patula* L. с бордовыми пятнами. Ксантофиллы накапливаются в хромопластах, так же как и у *T. erecta* L. в то время как антоцианы растворены в цитоплазме клетки. Именно поэтому при разрушении клеточной стенки антоцианы будут экстрагироваться первыми, а для экстракции каротиноидов необходимо разрушение мембраны хромопластов. Тогда становится понятным почему при помещении лепестков цветков в ацетон первыми извлекаются именно антоцианы, а для экстракции ксантофиллов необходимо механическое разрушение.



Рис. 6. Поперечный срез лепестков цветков *T. patula* L. с красной окраской цветков 10/0,25 x 10/18

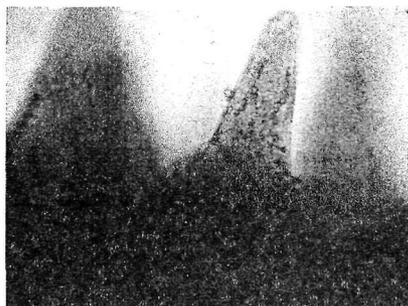


Рис. 7. Сосочковые клетки верхнего эпидермиса с хромопластами (в цитоплазме антоцианы) лепестков цветков *T. patula* L. 40/0,065 x 10/18

Практический интерес представляло исследование влияния накопления антоцианов на уровень содержания ксантофиллов. Так на рис. 8 представлены спектры солянокислого экстракта цветков бархатцев светло-вишневой и темно-вишневой окраски.

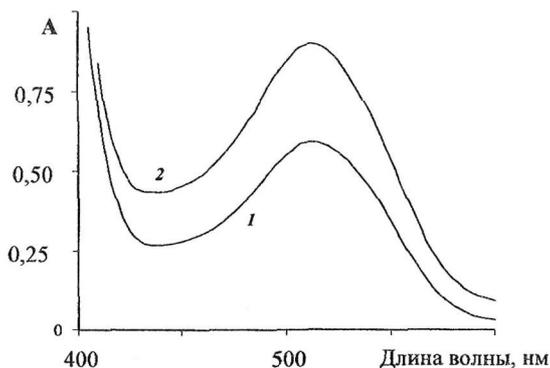


Рис. 8. Спектры солянокислых экстрактов лепестков цветков *T. patula* L.: 1 – экстракт с пятнами светло-вишневой окраски; 2 – экстракт с пятнами темно-вишневой окраски

Оба спектра практически идентичны, хотя записаны с интервалом в полмесяца. Но особо обращает внимание на себя тот факт, что, во-первых, виден шлейф от относительно коротковолнового поглощения, во-вторых, сам пик поглощения довольно широк и максимум смещен в длинноволновую область. Такой характер спектра может свидетельствовать о возможности копигментации антоцианов цветков бархатцев с сопутствующими экстрактивными веществами.

По данным ВЭЖХ исследований основным компонентом антоцианового комплекса является цианидина-3-глюкозид, хотя вклад других производных цианидина достаточно велик. При пересчете на цианидина-3-глюкозид (Giusti et al., 2000) содержание антоцианов в лепестках цветков с вишнево-красными пятнами различной интенсивности составило в среднем 1.40 мг/г лепестков. При этом анализ показал необычайно высокое накопление ксантофиллов (в пересчете на лютеин (Rodrigues-Amaya et al., 2004)), в среднем 2.9 мг/г свежих лепестков цветков. Важно, что при довольно большом разбросе показателей по содержанию пигментов никакой корреляции между содержанием антоцианов и ксантофиллов обнаружено не было. В 2006 году для образцов *T. patula* L. были получены другие результаты – 1.45 мг/г антоцианов и лишь порядка 2 мг/г ксантофиллов свежих лепестков цветков. Вполне возможно, что причина такого различия кроется в погодных условиях – данные этого года получены для образцов, собранных в начале августа, в то время как прошлогодние результаты датируются началом октября.

Соотношение между диэфирами практически не зависит от накопления антоцианов в лепестках (таблица 3).

Таблица 3

Относительное содержание различных видов диэфиров в диэфирной фракции

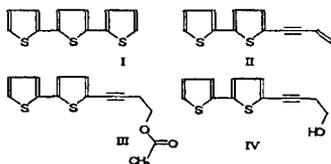
№	Радикалы кислот	Относительная доля диэфиров, моль %, ± 0,7%				
		<i>T. patula</i> L.				<i>T. erecta</i> L.
		а	б	в	г	
1	C12 + C14	6.1	5.8	5.8	6.5	2.6
2	C14 + C14	20.6	20.6	19.2	20.5	11.6
3	C14 + C16	30.9	32.7	31.4	31.8	23.2
4	C16 + C16	28.4	28.5	29.9	28.8	38.1
5	C16 + C18	11.5	10.6	11.7	10.3	18.9
6	C18 + C18	2.5	1.9	2.0	2.0	5.6

C12 – лауриновая, C14 – миристиновая, C16 – пальмитиновая и C18 – стеариновая кислоты; окраска цветков *T. patula* L.: а – темно вишнево-красная, б – вишнево-красная; в – бледно вишнево-красная; г – оранжевая; *T. erecta* L. – оранжевая.

Обнаруженные закономерности по характеру совместного накопления антоцианов и каротиноидов диктуют важную особенность подготовки образца к анализу. Растирание лепестков цветков с кварцевым песком приводит к возможности быстрой и полной экстракции каротиноидов. Впрочем, по ряду причин (включая необходимость отделения экстракта от мелкодисперсных частиц центрифугированием) предпочтение было отдано разминанию лепестков цветков под слоем экстрагента. Для определения антоцианов растирание свежих образцов лепестков цветков бархатцев с кварцевым песком недопустимо. Дело в том, что pH внутриклеточной жидкости лепестков цветков

равно примерно 5, а антоцианы уже при pH = 4.5 превращаются в неокрашенные псевдооснования (Goto, 1987). Последние подвержены превращению в *цис*-халконы (далее в *транс*-халконы, обратное превращение которых в антоцианы при подкислении – процесс медленный) и окислению. Вследствие указанных превращений было установлено, что выход антоцианов падает до 30%, а в некоторых случаях антоцианы терялись полностью при экстракции ацетоном.

К числу важнейших соединений, специфичных для некоторых растений семейства сложноцветные, а поэтому даже используемых в хемосистематике, относятся серосодержащие гетероциклические соединения – производные тиофенов и (или) тиарубринов (Gommers et al., 1976). Известно, что бархатцы во всех частях растения накапливают политиофены (Vasudevan et al., 1997). Эти соединения представляют большой интерес для регулирования численности нематод в почве, уничтожения некоторых насекомых, для борьбы с грибными заболеваниями и т.д. (Mukundan et al., 1990; Kyo et al., 1990; Fokialakis et al., 2006). Наиболее важными из политиофенов являются четыре соединения:



Липофильность, выраженная логарифмом коэффициента распределения вещества между октанолом-1 и водой, и коррелирующая с биологической активностью соединений (Hansch et al., 1964), достаточно высока для соединений I – IV и убывает в ряду I > II > III > IV. По литературным данным (Sütfeld et al., 1982) первые два соединения (самые липофильные из рассмотренного ряда) являются основными тиофенами, накапливающимися в боковых корнях бархатцев (*T. patula* L.). В других частях растений могут преобладать соединения III и IV. Хроматограммы экстрактов боковых корней бархатцев трех видов представлены на рис. 9.

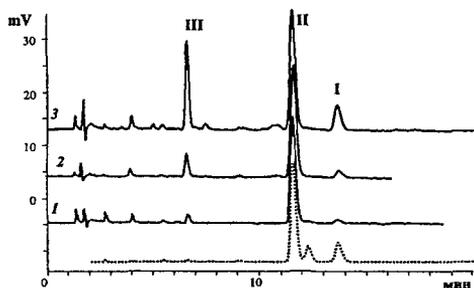


Рис. 9. Разделение тиофенов экстрактов корней растений рода *Tagetes*
 1 – *T. tenuifolia* L.; 2 – *T. patula* L.; 3 – *T. erecta* L.; пунктирная линия – *Echinops sphaerocephalus* L.. Колонка: 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижная фаза: вода – ацетонтрил (20 : 80 об.), 1 мл/мин., детектор: 340 нм.

Для трех изученных видов *Tagetes* основным тиофеном является второй компонент при переходе от *T. tenuifolia* L. к *T. erecta* L. увеличивается доля менее липофильного соединения III и более липофильного I. Вещества I-III были идентифицированы с использованием разделения экстракта на три фракции тиофенов с последующим определением соединений методом ГЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

Проблему количественного определения тиофенов решали комбинацией спектрофотометрического и хроматографического методов с учетом того, что молярные коэффициенты экстинкции тиофенов (I – III) различаются не более чем на 1-2% (Norton et al., 1985). В работе был использован молярный коэффициент экстинкции для соединения I, $\epsilon(I) = 24100 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{дм}^3 \cdot \text{см}^{-1}$ (Sease et al., 1947). Для количественного определения тиофенов в условиях ВЭЖХ выделяли концентрированную фракцию суммы соединений I + II, в полученном концентрате определяли концентрацию тиофенов спектрофотометрическим методом; этот же концентрат затем использовали для градуировки отклика детектора, используя в дальнейшем этот же градуировочный коэффициент для веществ I – III. Результаты определения тиофенов в некоторых объектах представлены в таблице 4.

Таблица 4

Содержание тиофенов I – III в корнях бархатцев и мордовника

Объект	Содержание тиофенов, г на 100 сухого материала			
	I	II	III	Сумма
<i>Tagetes tenuifolia</i> L. (бархатцы тонколистные)				
боковые корни	0,079 ± 0,005	0,722 ± 0,012	0,158 ± 0,003	0,959 ± 0,020
<i>T. patula</i> L. (бархатцы отклоненные)				
боковые корни	0,114 ± 0,007	0,535 ± 0,020	0,035 ± 0,005	0,684 ± 0,032
<i>T. erecta</i> L. (бархатцы прямостоячие)				
боковые корни	0,122 ± 0,005	0,172 ± 0,010	0,116 ± 0,010	0,418 ± 0,025
кора основного корня	0,012	0,071	0,827	0,911
основной корень	0,013	0,011	0,114	0,138
<i>Echinops sphaerocephalus</i> L. (мордовник шароголовый)				
боковые корни	0,394 ± 0,020	0,957 ± 0,005	0,018 ± 0,002	1,269 ± 0,027
кора основного корня	0,121	4,177	1,482	5,780
основной корень	0,002	0,113	0,041	0,156

Исследуя экстракты боковых корней других растений семейства Asteraceae (*Ambrosia artemisiifolia* L., *Echinops sphaerocephalus* L., *Solidago canadensis* L., *Tanacetum vulgare* L.), которые по литературным данным накапливают тиофены, мы только в экстракте *Echinops sphaerocephalus* L. обнаружили их в значительных количествах. Изучая особенности накопления тиофенов в главных корнях, нами было установлено, что большая часть этих соединений накапливается в коре, что связано с их биологической ролью в отпугивании вредителей.

ВЫВОДЫ

1. Видовой состав семейства Asteraceae на территории Белгородской области составляет 56 родов и 197 видов растений, из которых 12 видов занесены в Красную книгу Белгородской области, 15 являются кандидатами на включение, 8 видов впервые отмечены для Белгородской области, 7 видов относятся к исчезнувшим, нахождение которых вызывает сомнение, и 32 вида произрастают в культуре.

2. Типологическая структура дикорастущих растений семейства Asteraceae на территории Белгородской области соответствует биологическому спектру умеренно холодных зон, преимущественно степного типа и характеризующихся как умеренно антропогенно трансформированные.

3. В качестве эффективных источников для промышленного получения биологически активных веществ предложены растения рода *Tagetes* как источник лютеина, тиофенов; *Cosmos sulphureus* Cav. как источник лютеина, и *Echinops sphaerocephalus* L. как источник тиофенов.

4. У растений рода *Tagetes* ксантофиллы накапливаются в хромопластах, имеющих шарообразную форму, присутствуют во всех клетках мезофилла, но концентрируются в основном в эпидермальных; на цветки приходится 50 – 60% от массы соцветий, полезная масса выше у *Tagetes erecta* L.

5. Накопление ксантофиллов усиливается при увеличении их степени этерификации, следовательно, более предпочтительными для выращивания в условиях Белгородской области в промышленных масштабах являются растения с оранжевыми цветками вида *Tagetes erecta* L. сорта «Сиера оранжевый», содержащего до 4 мг/г диэфиров лютеина.

6. Накопление антоцианов не коррелирует с накоплением ксантофиллов, что позволяет рассматривать *Tagetes patula* L. как источники и ксантофиллов, и антоцианов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

* – работы, опубликованные в рекомендованных ВАК РФ изданиях

1. Колчанов А.Ф. Инвентаризация охраняемых территорий и сохранение видов / А.Ф. Колчанов, Р.А. Колчанов, А.А. Немыкин, М.Ю. Третьяков // Сборник студенческих научных работ: В 3-х ч. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – Вып. VII. – Ч. I. С. 103-107.

2. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – с. 53-264.

3. Третьяков М.Ю. Дикорастущие лекарственные растения семейства Asteraceae на территории Белгородской области / М.Ю. Третьяков, Ю.В. Захарова // Материалы Международной научно-практической конференции, 14 апреля 2006 г. – Белгород: ИПЦ «ПОЛИТЕРРА», 2006. – С. 140-144.

4. Третьяков М.Ю. Некоторые дикорастущие лекарственные растения семейства Asteraceae на территории Белгородской области / М.Ю. Третьяков //

Материалы Международной Конференции Молодых Ботаников в Санкт-Петербурге (21-26 мая 2006). – СПб. Издательство ГЭТУ, 2006, С. 276.

5. Третьяков М.Ю. Род *Tagetes* L. – перспективы его изучения / М.Ю. Третьяков, В.Н. Сорокопудов, В.И. Дейнека, Н.Н. Нетребенко // Материалы чтений, посвященных 300-летию с дня рождения К. Линнея / Ред. Соколов И.Д. – Луганск: Элтон-2, 2007. – С. 97-99.

6. Дейнека Л.А. Ксантофиллы лепестков цветков бархатцев: сорбционное концентрирование и сохранность при хранении / Л.А. Дейнека, А.А. Коробанова, М.Ю. Третьяков // Наука и устойчивое развитие общества. Наследие В.И. Вернадского: Сборник материалов 2-й международной научно-практической конференции 28-29 сентября 2007. – Тамбов: Издательство ТАМБОВПРИНТ, 2007. – С. 66-67.

7. Дейнека В.И. Исследование цветков *Tagetes* sp. как источника лютеина / В.И. Дейнека, В.Н. Сорокопудов, Л.А. Дейнека, М.Ю. Третьяков // Химико-фармацевтический журнал. Том 41, №10, Москва: «Фолиум», 2007. – С. 30-32.

8. Дейнека В.И. Исследование плодов *Physalis alkekengi* L. как источника ксантофиллов / В.И. Дейнека, В.Н. Сорокопудов, Л.А. Дейнека, М.Ю. Третьяков, В.В. Фесенко // Химико-фармацевтический журнал. Том 42, №2, Москва: «Фолиум», 2008 – С. 36-37.

9. Дейнека В.И. Некоторые особенности накопления пигментов в цветках *Tagetes* sp. / В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов // Научные ведомости Белгородского государственного университета серия естественные науки №5 (36) Вып. 5., 2007 – С. 123-129.

10. Коробанова А.А. Пищевой дизайн: Композиции ксантофиллов на основе растительных и животных жиров / А.А. Коробанова, М.Ю. Третьяков, Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека // Лекарственные растения и биологически активные вещества: фототерапия, фармация, фармакология: матер. междунар. научн.-практич. конф., посвященной Дню Российской науки, Белгород, 8 февраля 2008 г. / Под ред. профессора В.Н. Сорокопудова. – Белгород: «Политерра», 2008. – С. 87-91.

11. Сорокопудов В.Н. Дикорастущие лекарственные растения Белгородской области (ареал, биология, систематический состав, применение, препараты): монография / В.Н. Сорокопудов, О.О. Новиков, Н.Н. Нетребенко, М.Ю. Третьяков, Д.И. Писарев, Е.Ю. Тимошенко. Белгород: ИПЦ «Политерра», 2008. – 289 с.

12. Биологически активная добавка для кур и способ ее получения: заявка на патент № 2007113094. Дата приоритета 09.04.2007. Решение о выдаче патента от 28 января 2008 г.

