

УДК582.912.42.631.525

## ДИНАМІКА НАКОПИЧЕННЯ СТЕРОЇДНИХ ГЛІКОЗИДІВ У ЛИСТКАХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *RHODODENDRON L.* ПРОТЯГОМ ОНТОГЕНЕЗУ

Т.М. АНТОНЮК, О.А. ОКАНЕНКО, Н.Ю. ТАРАН

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
01033 Київ, вул. Володимирська, 64

Методом тонкошарової хроматографії досліджено вміст стероїдних глікозидів у листках представників роду *Rhododendron L.*, культивованих у природних умовах Лісостепу України. Визначено кількісний вміст стероїдних глікозидів протягом вегетаційного періоду. Встановлено залежність їх вмісту від фази онтогенезу.

*Ключові слова:* *Rhododendron L.*, стероїдні глікозиди, адаптація.

З великого арсеналу лікарської рослинної сировини особливо цікавими є представники роду рододендрон — *Rhododendron L.* Фармакологічний ефект цих рослин зумовлений не однією речовиною, а комплексом утворюваних у них вторинних метаболітів, таких як фенольні сполуки (у тім числі флавоноїди, фенолкарбонові кислоти), дубильні речовини, стероїдні сполуки, терпени, тритерпеноїди тощо [6].

В останні роки зросла зацікавленість стероїдними глікозидами як речовинами з широким спектром біологічної дії на живі організми. Їм властиві антимікробна, алелопатична, антиоксидантна [6], протівірусна, імуномодуюча активності [1]. Відомо, що стероїдні глікозиди за низьких концентрацій здатні гальмувати вільнорадикальне неферментативне окиснення субстратів, що є одним із проявів адаптаційних реакцій рослин на дію чинників навколишнього середовища [3].

Представники роду *Rhododendron L.* у цьому аспекті досліджені недостатньо. Тому з огляду на наявну в літературі інформацію щодо функцій стероїдних глікозидів у метаболізмі рослин [3, 9], ми дослідили видову специфіку накопичення стероїдних глікозидів вегетативними органами рослин представників роду *Rhododendron L.* та динаміку їх вмісту протягом періоду вегетації.

### Методика

Наша робота полягала у вивченні вмісту стероїдних глікозидів методом тонкошарової хроматографії. Результати дослідження цих показників дадуть змогу виявити їх зміни в процесі онтогенезу, з'ясувати вплив на них погодних умов, запропонувати найоптимальніші періоди заготівлі рослин як перспективного джерела стероїдних глікозидів.

Об'єктами дослідження були 9 представників роду *Rhododendron L.*: вічнозелених (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*), напіввічнозелених (*Rh. obtusum*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*) та листопадних (*Rh. occiden-*

*tale*, *Rh. arborescens*, *Rh. reticulatum*) видів, інтродукованих у кліматичних умовах Лісостепу України.

Дослідження проведено на території ботанічного саду імені акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка у період з квітня по листопад 2008 р., тобто від початку вегетації до плодоношення рослин.

Погодні умови протягом вегетації були типовими для середньої зони Лісостепу України. Температура не перевищувала середні багаторічні значення і коливалась у межах +27...+4 °С.

Стероїдні глікозиди екстрагували за методом Зілла і Хармона в модифікації Яковенко і Міхно [5]. Якісний аналіз цих сполук проводили в системах розчинників гексан—діетиловий ефір—оцтова кислота (85:15:1) та хлороформ—метанол—оцтова кислота (100:1:0,2) [4]. Ідентифікували стероїдні глікозиди за допомогою специфічних реактивів: на стероли — стибію,  $\text{FeCl}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{CH}_3\text{COOH}$ , на карбогідрати — орцину [4] та специфічних до стероїдних глікозидів реактивів Саньє [9], Ерліха [7]. Вміст стероїдних глікозидів визначали методом денситометрії хроматограм [9] у перерахунку на  $\beta$ -ситостерол. Для побудови гістограм використовували середні арифметичні значення з трьох біологічних та трьох аналітичних повторностей. Вірогідність відмінностей оцінювали методом порівняння середніх показників за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали істотними за  $p < 0,05$ . Фенологічні спостереження проводили за загальноприйнятною методикою [2].

### Результати та обговорення

Серед отриманих даних екстрагування речовин представників роду *Rhododendron* L. нашу увагу привернули специфічно розміщені на всіх хроматограмах плями різної інтенсивності для різних видів. Застосувавши специфічний проявник на глікозиди — орцин, ми припустили, що речовини у фракції нейтральних ліпідів є стероїдними глікозидами. Відомо, що ці сполуки можуть розкладатись до вільних стеролів, ефірів стеролів, глікозидів стеролів або ацильованих глікозидів стеролів [4], можуть бути локалізовані в різних органах.

Залежно від будови стероїдної частини стероїдні глікозиди поділяють на дві основні групи: стероїдні глікозиди ряду спіростану (спіростанолові) і стероїдні глікозиди ряду фуростану (фуростанолові). Спіростанолові глікозиди накопичуються переважно в запасуючих органах (кореневище, насіння), фуростанолові — в надземних асимілюючих органах (стебло, листки). Як у зелених, так і в етіольованих протопластах, вакуолях епідермальних клітин і мезофілу містяться в основному стероли та їх похідні (глікозилстероли, ацильовані стероли), тоді як стероїдні глікозиди — переважно в епідермальних клітинах листків [10].

Під час дослідження фотосинтетичних тканин представників роду рододендрон у різних системах розчинників (рис. 1) ідентифіковано стероїдні глікозиди, якісний склад яких підтверджено за допомогою специфічних реактивів: на стероли — стибію,  $\text{FeCl}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{CH}_3\text{COOH}$ , реактиву Саньє, який дає рожеве забарвлення з глікозидами фуростанолового ряду і помаранчеве — з глікозидами спіростанолового ряду; реактиву Ерліха, який позитивно реагує лише з глікозидами фуростанолового ряду, та орцину, який дає бузково-червоне забарвлення з карбогідратами. Крім того, за допомогою специфічних проявників реактивів Саньє

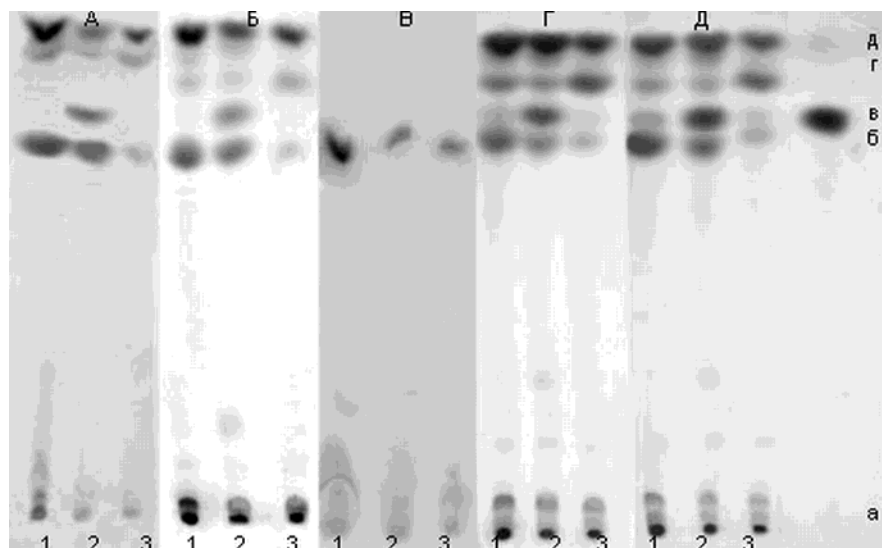


Рис. 1. Хроматографічний розподіл стероїдних глікозидів у листках. Система розчинників: хлороформ—метанол—оцтова кислота (100:1:0,2);

1 — *Rh. amesiae*; 2 — *Rh. ledebourii*; 3 — *Rh. reticulatum*; А–Д — проявники (А — стибій, Б — орцин, В — реактив Ерліха, Г — реактив Саньє, Д —  $\text{FeCl}_3 : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{CH}_3\text{COOH}$ ); а — старт; б — стероїдні глікозиди; в — стероли; г — не визначені сполуки; д — фронт

та Ерліха ідентифіковано стероїдні глікозиди, які можна віднести до фураностанолового ряду.

Компартменталізація стеролів у рослинних клітинах відбувається в мікосомальній фракції, мітохондріях та апараті Гольджі [4]. Вони входять до складу клітинних стінок [4], тому можна припустити, що погодні умови й період розвитку рослини відіграють істотну роль у зміні вмісту стероїдних глікозидів, задіяних у ростових та адаптивних процесах.

Кількісним аналізом вмісту стероїдних глікозидів у листках рододендронів (рис. 2) протягом вегетації (початок квітня—кінець листопада) виявлено видову і часову специфіку накопичення цих речовин.

Початок вегетаційного періоду (в усіх досліджених видів розпочинається у квітні) характеризувався високим вмістом стероїдних глікозидів у вічнозелених (*Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*) та напіввічнозелених (*Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*) видів, у яких активна вегетація настає на початку квітня. Листопадні види характеризувались відносно низьким вмістом стероїдних глікозидів, можливо, це по'язано з тим, що період активної вегетації в них розпочинається у третій декаді квітня. Накопичення стероїдних глікозидів у листках рослин у квітні можна пов'язати з підвищенням активності метаболічних процесів у молодих тканинах за інтенсивного росту рослин у цей період, оскільки відомо, що ліпіди підтримують рідинно-кристалічний стан мембран, що забезпечує максимальну активність мембранних ферментів. Навесні це потрібно для росту рослин, восени — для підвищення їх стійкості до низьких температур.

Роль стероїдних глікозидів у рослинах вивчена недостатньо, немає даних і щодо їх кількісного вмісту в різних частинах клітини. Ці сполуки розглядають насамперед як мембранні ліпіди, що не акумулюються всередині клітини та в інших специфічних тканинах [10]. Тому синтез стеролів можна пов'язувати лише з їх роллю у зміні проникності клітинних мембран рослин протягом таких фізіологічних змін, як стрес. Зок-

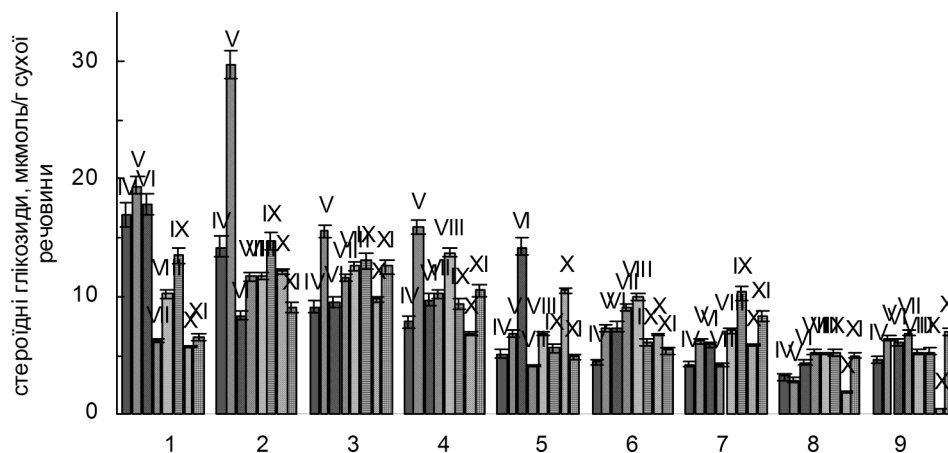


Рис. 2. Зміна вмісту стероїдних глікозидів у листках протягом вегетації:

IV—XI — відповідно місяці квітень—листопад; 1 — *Rh. ledebourii*; 2 — *Rh. amesiae*; 3 — *Rh. micranthum*; 4 — *Rh. ponticum*; 5 — *Rh. fortunei*; 6 — *Rh. obtusum*; 7 — *Rh. occidentale*; 8 — *Rh. arborescens*; 9 — *Rh. reticulatum*

рема, фураностанолові глікозиди впливають на склад хлоропластних фотосинтетичних пігментів. На рослинах томатів, уражених галовою нематою (модель біотичного стресу) й оброблених фураностаноловими глікозидами, спостерігали значне збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів (на 15,7 %), у фракції каротиноїдів — трансформації, пов'язані зі зниженням частки  $\beta$ -каротину і зростанням частки ксантофілів [1]. Ймовірно, фураностанолові глікозиди зміщують метаболізм каротиноїдів у бік утворення пігментів віолаксантинового циклу, та відіграють захисну роль і можуть сприяти стабілізації фотосинтетичного апарату, особливо в змінних кліматичних умовах вегетаційного періоду.

На підставі стимулювання росту, розвитку та фітоімунітету рослин фураностаноловими глікозидами ці сполуки можна розглядати як природні адаптогени [3]. Стероїдні глікозиди виявляють антимутагенну активність, обумовлену їх антиоксидантними властивостями через рухливість атома водню аглікону, який здатний утворювати стабільний проміжний радикал [1] і тим самим виконувати антиоксидантну роль у клітинах.

У період масового цвітіння істотно зростала кількість стероїдних глікозидів в усіх досліджених видів. Так, у *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*, *Rh. occidentale*, *Rh. reticulatum* цей період припадав на травень, у *Rh. fortunei*, *Rh. obtusum*, *Rh. arborescens* — на кінець травня — початок червня, оскільки стероїдні глікозиди насамперед є структурними компонентами клітин і мембранних органел, регулюють плинність і проникність мембран. Фітостероли також залучені у пов'язані з мембраною метаболічні процеси, вони необхідні для передачі сигналів, регулюють транскрипцію і трансляцію, диференціацію клітин, їх ріст [8]. Зростання вмісту стероїдних глікозидів у цей період можливо пов'язане саме з процесами диференціації клітин і початком формування генеративних органів. Є дані, що стероїдні глікозиди утворюються насамперед у клітинах, що не діляться, після закінчення росту, хоча висока концентрація стероїдів була помічена в репродуктивних органах і меристемах рослин [10].

Навесні частина фураностанолових глікозидів може трансформуватись у спіростанолові глікозиди. Цей процес супроводжується відщепленням глюкози від C-26 атома аглікону, в результаті чого утворюються речови-

ни, які мають проліферативну активність і можуть бути індукторами ростових процесів у рослинному організмі [8].

Значне зниження вмісту стероїдних глікозидів в усіх досліджених видів спостерігалось у період дозрівання плодів, який у *Rh. amesiae*, *Rh. fortunei*, *Rh. obtusum* припадає на листопад, у *Rh. ponticum*, *Rh. micranthum*, *Rh. ledebourii*, *Rh. occidentale*, *Rh. reticulatum*, *Rh. arborescens* — на жовтень. Отже, можна припустити, що зниження в листках рослин рівня стероїдних глікозидів восени пов'язане з їх накопиченням у плодах, оскільки вони здатні виконувати функції запасних речовин, а в надлишкових кількостях — інгібувати ріст рослин. Стероїдні сполуки можуть зв'язуватись рецепторами цитоплазми. Комплекс рецептора з гормоном здатний проникати крізь ядерну мембрану (механізм цього процесу з'ясований недостатньо) і в ядрі зв'язуватись зі спеціальними ділянками хроматину, змінюючи швидкість транскрипції певних генів. Стимуляція транскрипції призводить до збільшення кількості молекул мРНК і тим самим — до підвищення внутрішньоклітинного рівня кодованих ними білків. Результатом їхньої дії є посилення метаболічних процесів, що вже відбуваються, а не індукція нових. Маючи поліфункціональний тип дії, вони виявляють його на рівні експресії генома, впливають на метаболізм рослин, змінюють їх продуктивність [2]. Тому ми припустили, що стероїдні глікозиди беруть участь у процесах регуляції формування плодів (насіння).

На сьогодні досліджено відомі рослини-донори стероїдних глікозидів, до яких належать і представники роду *Rhododendron* L. Разом із цим розширення сировинної бази лікарських засобів потребує пошуку оптимальних джерел стероїдних глікозидів на основі з'ясування видових та онтогенетичних особливостей накопичення цих речовин.

У нашій роботі доведено наявність стероїдних глікозидів у листках 9 видів представників роду *Rhododendron* L. пересічно від 19,7 до 14,3 мкмоль/г сухої речовини. У результаті проведення досліджень динаміки накопичення стероїдних глікозидів у листках рододендронів встановлено видову і часову специфіку їх накопичення. Максимальне накопичення стероїдних глікозидів залежно від виду припадає на травень—червень. У видовому плані найперспективнішим джерелом стероїдних глікозидів можуть бути представники (у порядку зменшення) *Rh. ledebourii*, *Rh. amesiae*, *Rh. micranthum*. Згідно з результатами досліджень, рододендрони, інтродуковані на території України, можна використовувати як перспективне джерело стероїдних глікозидів.

1. Васильева И.С., Ванюшкин С.А., Зиновьева С.В. и др. Адаптогенное действие фураностаноловых гликозидов *Dioscorea deltoidea* Wall на окислительные процессы растений томатов в условиях биотического стресса // Прикл. биохимия и микробиология. — 2005. — 41. — С. 347—353.
2. Головач А.Г. Фенологические наблюдения в садах и парках. — М.: Наука, 1955. — 55 с.
3. Кинтя П.К. Природные биорегуляторы стероидного типа в сельском хозяйстве // Тез. II Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений». — М., 1993. — Ч. 1. — С. 97.
4. Таран Н.Ю., Косик О.І., Оканенко О.А., Бацманова Л.М. Ліпіди рослин. — К.: Ленвіт, 2006. — 104 с.
5. Яковенко Г.М., Михно А.И. Методы выделения и разделения по классам липидов хлоропластов растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 1971. — 3, № 6. — С. 651—656.
6. Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari B. et al. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis // Mol. Biol. Cell. — 2002. — 13. — P. 2664—2680.
7. Kintia P.K., Shvets S.A., Naibi M.A. Isolation and analysis of steroids compounds from *Petunia hybrid* L. // Seeds. Summaries of Papers of the 5<sup>th</sup> Sympos. on the Analysis of Steroides. — Szombathely, 1993. — P. 25.

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

---

8. *Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.* Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling // *Trends. Plant Sci.* — 2003. — **8**. — P. 1360—1385.
9. *Sannie C., Lapin H.* Recherches sur les sapogenines a noyau sterolique. Identification de les genines sur les petites quantites des plantes // *Bull. Soc. Chim. — France.* — 1952. — **11**, N 19. — P. 1080—1085.
10. *Wojciechowski Z.A.* Biochemistry of phytosterols conjugates // *Physiology and Biochemistry of Sterols — AOCS.* — Champaign, 1991. — P. 361—393.

Отримано 07.05.2009

### ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ В ЛИСТЬЯХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *RHODODENDRON* L. В ТЕЧЕНИЕ ОНТОГЕНЕЗА

*Т.Н. Антонюк, А.А. Оканенко, Н.Ю. Таран*

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Методом тонкослойной хроматографии исследовано содержание стероидных гликозидов в листьях представителей рода *Rhododendron* L., культивируемых в естественных условиях Лесостепи Украины. Определено количественное содержание стероидных гликозидов в течение вегетационного периода. Установлена зависимость их содержания от фазы онтогенеза.

### STERYL GLYCOSIDE ACCUMULATION DYNAMICS IN LEAVES OF *RHODODENDRON* L. DURING ONTOGENESIS

*T.N. Antonyuk, O.A. Okanenko, N.Yu. Taran*

Taras Shevchenko Kyiv National University  
64 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine

Steryl glycoside content in leaves of *Rhododendron* L. cultivated in the natural conditions of wood-steppe of Ukraine was determined during ontogenesis. Dependence of steryl glycoside content upon the phase of plant ontogenesis was revealed. Quantity of the substances was maximal at the period of flowering of plants and minimum at the period of fruits forming.

*Key words:* *Rhododendron* L., steryl glycoside, adaptation.