

The Daily Dynamics of Phenolic Compounds Content and Guaiacol-Peroksidase Activity in Leaves and Flowers of *Alchemilla subcrenata* and *Veronica chamaedrys*

Zhivetev M.A.¹, Dudareva L.V.¹, Rudikovskaya E.G.¹,
Graskova I.A.^{1,2}, Voinikov V.K.¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

² The Irkutsk Scientific Center of SB RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Received October 27, 2015

The daily dynamics of peroxidase activity and the total content of phenolic compounds in leaves and inflorescences of *Alchemilla subcrenata* Buser and *Veronica chamaedrys* L. were studied. Significant changes in the content of phenolic compounds and activity peroksidase depending on the time of day was shown.

Key words: medicinal plants, *Alchemilla subcrenata* Buser, *Veronica chamaedrys* L., temperature, peroxidase, phenolic compounds

В течение суток растения оказываются под влиянием сильных флуктуаций условий окружающей среды, и в первую очередь температуры. На территории Сибири такие перепады особенно выражены и достигают вне зависимости от времени года 15-20 °С.

Пероксидаза играет важную роль в стресс-адаптации, в том числе при гипотермическом влиянии (Rogozhin, 2004). Фермент использует перекись в качестве акцептора водорода, в то время как донором могут выступать различные соединения – цитохром с, нитриты, аскорбиновая кислота, индол, амины, также фенольные соединения (Dikson and Uebb, 1982; Fielder, 1976). На сегодняшний день гистохимически показана совместная локализация полифенолов и пероксидазной активности на ряде видов растений, причем высокому содержанию фенолов сопутствуют конституционно высокие активности пероксидазы (Lavid *et al.*, 2001). Широко известно, что стресс-толерантные растения обычно содержат высокий конститутивный уровень защитных метаболитов, в то время как более чувствительные растения показывают их индукцию под стрессом. Фенолы, танины и пероксидазная активность у многих растений участвуют в полимеризации полифенолов при защите от стресса, вызванного тяжелыми металлами (Lavid *et al.*, 2001) и у устойчивых растений при вторжении патогена (Rogozhin, 2004). Ферменты, вовлекаемые в полимеризационные процессы фенолов – это фенолоксидазы: такие как лакказа,

полифенолоксидаза и пероксидаза. Sherman с соавторами (1991) показали, что накопление полифенолоксидазы, широко распространенной в наземных растениях, но не водорослях, может происходить одновременно с адаптацией к окислительной атмосфере, где активность полифенолоксидазы жизненно необходима в фотосинтетическом аппарате, уязвимом к атмосферному кислороду. Также фотосинтез может играть косвенную роль, снабжая перекисью водорода (побочным продуктом фотосинтеза) реакцию полимеризации полифенолов пероксидазой, как предположено Yamasaki и др. (1997).

Манжетка богата танинами и особенно накапливает их к осени (Zorina, 2009), и обладает развитыми клеточными стенками, что должно давать ей адаптивные преимущества. Поэтому изучение в манжетке полифенолов и активности ферментов, участвующих в их метаболизме, представляется весьма интересным.

Соответственно целью наших исследований было изучить динамику фенольных соединений и активности слабосвязанных с клеточной стенкой и растворимых гваяколпероксидаз в листьях манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser в условиях суточных перепадов температур атмосферного воздуха в сравнении с другим лекарственным растением – вероникой дубравной *Veronica chamaedrys* L.

MATERIALS AND METHODS

Исследовались листья и соцветия манжетки

городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser и вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L., собранные в пойме реки Выдринная, в шестистах метрах от уреза оз. Байкал, левый берег реки на территории стационара СИФИБР «Речка Выдринная», разнотравный луг. Учитывая динамику температурного режима, пробы отбирались в третьей декаде июня в 8-9 часов после суточного минимума температур, в 14-15 во время максимально высокой температуры и в 20-21 ч на вечернем спаде температуры. Отбирались средневзвешенные образцы в трех повторностях в течение суток утром, в обед и вечером. Все биохимические исследования проводили в трех аналитических повторностях. С целью уменьшения возможных автолитических изменений образцы фиксировали в жидком азоте. Выделение гваяколпероксидаз осуществляли так, как описано в работе (Graskova, 2004). Выделение фенольных соединений осуществляли тройным экстрагированием кипящим 80% метанолом и очисткой объединенного экстракта хлороформом от липофильных пигментов по стандартной методике с последующей экстракцией фенольного комплекса этилацетатом. Общее содержание определяли спектрометрическим методом с помощью реактива Фолина-Дениса при 720 нм (Zaprometov, 1971) с помощью SPECORD S 100 («Analytikjena», Германия). Для построения калибровочной кривой использовали коммерческий препарат кверцетина («Sigma», США). Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием

компьютерных программ StatSoft (Statistica 6,0).

RESULTS AND DISCUSSION

Средние значения и стандартные отклонения общего содержания фенольных соединений и активности слабосвязанной с клеточной стенкой, растворимой и общей гваякол-зависимых пероксидаз в 9, 14 и 21 ч в листьях и соцветиях манжетки городковатой и вероники дубравной приведены в табл. 1.

Нами установлено, что содержание фенольных соединений и активность пероксидаз зависит не только от вида и органа растения, но и от времени суток. При этом во всех случаях наблюдается повышение активности общей гваякол-зависимой пероксидазы в полуденную жару, что может свидетельствовать о высокотемпературном стрессе растений в это время суток.

Как правило, активность слабосвязанной с клеточной стенкой фракции пероксидаз ниже, чем общей и растворимой пероксидазы, однако динамика их суточных изменений чаще всего одинакова. Активность пероксидаз в генеративных органах (соцветиях) заметно отличается от активности в вегетативных органах (листьях).

В цветках манжетки активность растворимой и общей пероксидазы выше, чем в листьях, а активность пероксидазы слабосвязанной с клеточной стенкой, наоборот, ниже. Активность пероксидаз у вероники заметно ниже, чем у манжетки, и в ее листьях значения активности пероксидазы выше, чем в цветках, что свидетельствует о значительных видовых различиях этих растений.

Динамика содержания фенольных соединений также демонстрировала выраженную видо- и тканеспецифичность. У вероники содержание фенольных соединений в соцветиях в каждый временной отрезок было стабильно выше, чем в листьях, но при этом их динамика совпадала и максимум приходился на 9 ч утра с последующим уменьшением в течение дня. Соцветия манжетки продемонстрировали наряду с высокой

активностью гваякол-пероксидазы стабильно высокие содержания фенольных соединений в течение всех суток, в то время как в листьях этого растения в 15 ч наблюдалось скачкообразное увеличение содержание полифенолов с последующим минимумом в 21 ч при относительно слабом росте активности фермента, окисляющего фенолы.

Table 1. Активность гваякол-зависимых пероксидаз и общее содержание фенольных соединений в листьях и соцветиях манжетки городковатой и вероники дубравной в разное время суток.

Время суток, ч	Активность пероксидаз, у.е./мг сырого веса			Содержание фенольных соединений, мг/г сырой массы
	Слабосвязанная с клеточной стенкой пероксидаза	Растворимая пероксидаза	Общая пероксидаза	
<i>Alchemilla subcrenata</i> , листья				
9.00	0,075 ± 0,006	0,176 ± 0,039	0,165 ± 0,022	3,28 ± 0,73
14.00	0,099 ± 0,005	0,161 ± 0,040	0,194 ± 0,025	5,31 ± 0,57
21.00	0,095 ± 0,004	0,191 ± 0,053	0,192 ± 0,033	1,25 ± 0,06
<i>Alchemilla subcrenata</i> , соцветия				
9.00	0,041 ± 0,005	0,201 ± 0,012	0,227 ± 0,003	3,95 ± 0,43
14.00	0,085 ± 0,005	0,365 ± 0,049	0,406 ± 0,015	3,81 ± 0,18
21.00	0,041 ± 0,003	0,248 ± 0,038	0,289 ± 0,027	3,12 ± 0,15
<i>Veronica chamaedrys</i> , листья				
9.00	0,011 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,049 ± 0,001	4,10 ± 0,27
14.00	0,016 ± 0,001	0,026 ± 0,003	0,059 ± 0,006	2,29 ± 0,14
21.00	0,012 ± 0,002	0,020 ± 0,000	0,041 ± 0,004	1,69 ± 0,11
<i>Veronica chamaedrys</i> , соцветия				
9.00	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,034 ± 0,002	4,22 ± 0,29
14.00	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,000	0,043 ± 0,002	2,79 ± 0,40
21.00	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,032 ± 0,007	2,30 ± 0,26

CONCLUSIONS

Исследовались листья и соцветия манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser и вероники дубравной *Veronica chamaedrys* L. собранные в пойме реки Выдриная, в шестистах метрах от уреза оз. Байкал. На примере двух видов

лекарственных растений показаны существенные изменения содержания фенольных соединений и активности пероксидаз в зависимости от времени суток.

ACKNOWLEDGMENT

Работа выполнена при поддержке

Интеграционной программы «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».

REFERENCES

- Dikson M. and Uebb E. (1982) *Fermenty*. M.: Mir, 1, 322 s. (in Russian).
- Fielder M.R. (1976) Genetic control of four cathodal peroxidase isozymes in barley. *J. Heredity*, **67(1)**, 39-42.
- Graskova I.A., Borovskij G.B., Kolesnichenko A.V. and Voinikov V.K. (2004) Peroksidaza kak komponent signalnoj sistemy kletok kartofelya pri patogeneze kolyzevoj gnili. *Fiziologija rastenij*, **51(5)**, 692-697. (in Russian).
- Lavid N., Schwartz A., Yarden O. and Tel-Or E. (2001) The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*, **212**, 323-321.
- Rogozhin V.V. (2004) Peroksidaza kak komponent antioksidantnoj sistemy zhivyh organizmov. SPb.: GIOR, 240 s. (in Russian).
- Sherman T.D., Vaughn K.C. and Duke S.O. (1991) A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **30**, 2499-2506.
- Yamasaki H., Sakihama Y. and Ikehara N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol*, **115**, 1405-1412.
- Zaprometov M.N. (1971) Fenolnye soedineniya i metody ih issledovaniya. *Biohimicheskiye metody v fiziologii rastenij*. (pod. red. O.A. Pavlinoj). M.: Nauka, 185-197. (in Russian).
- Zorina E.V. (2009) Farmagnosticheskoe izuchenie vidov roda *Alchemilla* L. Permskogo kraja. Avtoref. diss. na soisk. uch. st. kand. farmats. Nauk, Perm, 21 s. (in Russian).