

ИССЛЕДОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ДУБРОВНИКА ДИКОГО Research of the culture of the wild germander

В. А. Петров, магистрант

И. А. Старицына, кандидат геолого-минералогических наук, доцент
Уральский государственный аграрный университет
(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

Рецензент: Н. В. Вашукевич, кандидат биологических наук, доцент

Аннотация

В статье проведён анализ научных данных зарубежной работы по изучению морфологии и фитохимии культуры дубровника дикого, выращиваемого в экспериментальном Ботаническом саду Гирарди (Ломбардия, Северная Италия). В исследованиях рассматривается структура трихом растения. При рассмотрении определяется состав летучих веществ, выделяемых железистыми трихомами. Определяется взаимодействие растений дубровника дикого и окружающей среды.

Ключевые слова: дубровник дикий, трихомы, ЛОС (летучие органические соединения), ботанический сад.

Summary

The article analyzes the scientific data of foreign work on the study of morphology and phytochemistry of the wild germander culture grown in the experimental Botanical Garden of Girardi (Lombardy, Northern Italy). The research examines the structure of the trichomes of the plant. When considering, the composition of volatile substances released by glandular trichomes is determined. The interaction of wild germander plants and the environment is determined.

Keywords: wild germander, trichomes, VOCs (Volatile organic compounds), Botanic garden.

Дубровник обыкновенный (лат. *Teucrium chamaedrrys*), обычно называемый диким дубровником, представляет собой полукустарниковый, высокополиморфный вид, произрастающий в Европе и Юго-Западной Азии. Он представлен разветвлённым корневищем и многочисленными простыми стеблями, которые могут достигать высоты до 30 см, прямостоячими восходящими, четырехугольными и опушёнными [3]. Листья также опушённые, напоминают миниатюрные листья дуба (видовой эпитет хамедри означает «стелящийся дуб», имея в виду его почвопокровное произрастание). Цветки от бледно-фиолетового до тёмно-фиолетового цвета, появляются в верхушечных соцветиях с конца весны до начала лета. Растёт на засушливых лугах, каменистых и солнечных склонах, в ксерофильных сосновых и дубовых лесах на высотах до 1700 м над уровнем моря. Дубровник обыкновенный — медонос, обладает лекарственными свойствами. Действующие вещества: эфирные масла, горечи, дубильные вещества. Его также выращивают в декоративных целях из-за его привлекательной, ароматной и вечнозелёной листвы [6, 2, 3].

Научная работа была проведена в Ботаническом саду «G.E. Ghirardi» - управляемым Миланским университетом и расположенным на Виа Религионе, Тосколано-Мадерно, на западном берегу озера Гарда, провинция Брешиа, Ломбардия, Италия. Этот Ботанический сад также известен как экспериментальный Ботанический сад «Giardino sperimentale "E. Гирарди"» и

«Орто ботанико Тосколано Мадерно». Занимаемая площадь около 10 000 м². Назван в честь своего основателя – профессора Джордано Эмилио Гирарди. Сад был основан в 1964 году как Экспериментальная Сельскохозяйственная Станция «Мимоза» (Stazione Agricola Sperimentale «Mimosa»). В 1991 году он стал частью Миланского университета и сегодня в основном выращивает растения, представляющие интерес для медицины и фармацевтики, но также поддерживает исследования в области трансгенных (генно-модифицированных) растений [5, 4].

Итальянские учёные исследовали культуру дубровника дикого или обыкновенного (Яснотковые), культивируемого в Ботаническом саду Гирарди. Изучали дубровник с помощью четырёхуровневого исследовательского подхода. Были выполнены последующие, дополняющие этапы исследования: 1) микроскопический – для описания морфологии и характера распределения железистых и нежелезистых трихом на вегетативных и репродуктивных органах с помощью световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии; 2) гистохимический – для выявления основных классов вторичных метаболитов, входящих в состав секреторных продуктов; 3) фитохимический – для отображения в качестве элемента новизны профилей выбросов ЛОС из листьев и цветов с помощью анализа твердофазной микроэкстракции (HS-SPME); 4) экологический – для того, чтобы провести связь между профилями летучих соединений и потенциальным взаимодействием растений на окружающую среду посредством литературной оценки экологической роли основных соединений. Также, эта работа являлась частью проекта под названием «Ботанический сад, фабрика молекул», направленного на расширение растительного наследия Ботанического сада Гирарди в соответствии с перспективами многомасштабных исследований: микроскопических, фитохимических и биоэкологических.

В исследовании наблюдались три морфотипа трихом с разным характером распределения на вегетативных и репродуктивных органах: щитковидные и короткостебельные головчатые трихомы, повсеместно распространённые на всём растении, так и длинностебельные головчатые, встречающиеся исключительно на цветочных мутовках. Как щитки, так и длинностебельные головчатые были признаны основными местами производства терпенов. Анализ твердофазной микроэкстракции (HS-SPME) показал, что цветы имеют наиболее сложный качественный профиль. Согласно проверке литературных данных авторами исследования, у дубровника преобладает защитное действие как на уровне вегетативных, так и репродуктивных органов, наряду с потенциальной привлекающей ролью, которую играет цветочный аромат [9].

Структуру трихом, характер распределения и гистохимию на вегетативных и репродуктивных органах (стебли, листья, прицветники, чашечки и венчики) итальянские ботаники исследовали с помощью световой микроскопии (ЛМ), флуоресцентной микроскопии (ФМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для оценки изменчивости микроморфологических признаков исследовали не менее десяти повторов на каждую часть растения. Распределение трихом качественно оценивали по следующим символам: (-) отсутствует, не наблюдается ни в одной из повторностей; (±) периодически не более чем в четырёх повторностях; (+) присутствует во всех повторностях; (++) в большом количестве во всех повторах с распределением по всей поверхности органа [9].

Эпидермальные поверхности исследуемых органов предварительно осматривали ЛМ на ручных срезах. Также были проанализированы образцы, фиксированные FAA (синтетический фиксатор), затем обезвоженные этанолом и залитые в Техновит/Historesin; их делали на микротоме. Использовали следующие гистохимические красители: толуидиновый синий в качестве общего красителя, Флуоресцентный Жёлтый-088 для общих липидов, Нильский красный для нейтральных липидов, реагент Нади для терпенов, PAS-реакция на сумму полисахаридов,

Рутениевый Красный для кислых полисахаридов, Альциановый Синий для мукополисахаридов и трихлорид железа для полифенолов. Параллельно учёными проводились контрольные окраски. Наблюдения проводились под флуоресцентным микроскопом Leitz DM-RB с приставкой Nikon.®цифровая камера [9].

Для наблюдений с помощью СЭМ, небольшие сегменты стебля, листа, прицветника, чашечки и венчика фиксировали FAA (синтетический фиксатор) в течение 4 дней, обезвоживали ацетоном, максимально осушивали и покрывали углеродным золотом. Наблюдения проводились с помощью Philips.®XL 20 SEM на 15 кВ [9].

Три листа и три цветка срезали и сразу помещали в отдельные стеклянные флаконы подходящего для анализа объёма. Для отбора проб в свободном пространстве использовались устройства Supelco SPME (твёрдофазная микроэкстракция), покрытые полидиметилсилоксаном (ПДМС, 100 мкм); одно и то же новое волокно, предварительно кондиционированное в соответствии с инструкциями производителя, использовалось для всех анализов. После 30-минутного уравнивания волокно выдерживали в свободном пространстве над образцом в течение 30 минут. Как время уравнивания, так и время отбора проб были определены итальянскими ботаниками экспериментально, чтобы достичь оптимальной адсорбции летучих веществ и избежать как недо-, так и перенасыщения волокна ионной ловушки масс-спектрометра. После завершения процедуры отбора проб, волокно изымали иглой и переносили в порт ввода системы ГХ-МС. Условия отбора и десорбции для всех образцов были одинаковыми. Кроме того, холостые пробы выполняли перед каждым первым SPME экстракции и случайным образом повторяли в течение каждой серии. Количественные сравнения относительных площадей пиков были выполнены для одних и тех же соединений в разных образцах. ГХ-МС анализ - Газовая хроматография-масс-спектрометра с электронным ударом (ГХ-ЭИ-МС) выполнялась на газовом хроматографе Varian CP-3800, оснащённом Agilent DB-5. Капиллярная колонка (30 мм × 0,25 мм; толщина пленки 0,25 мкм) и масс-детектор с ионной ловушкой Varian Saturn 2000. Аналитические условия были следующими: температуры инжектора и линии передачи 220 и 240°C соответственно; температура духовки запрограммирована на повышение с 60 до 240°C, в 3°C мин⁻¹; газ-носитель – гелий при 1 мл мин⁻¹; безраздельный впрыск. Идентификация компонентов была основана на сравнении времени их удерживания с временем удерживания аутентичных образцов (при их наличии), сравнении их линейных индексов удерживания с серией чистых образцов n-гидрокарбонов (C5-C25). Компьютерное сопоставление также использовалось против коммерческих и библиотечных лабораторных масс-спектров, построенных из чистых веществ и компонентов коммерческих эфирных масел известного состава и литературных данных [9].

В результате проведённых опытов и наблюдений, итальянскими учёными было выявлено, что вегетативные и репродуктивные органы характеризуются железисто-волосковым покровом, состоящем из щитовидных и головчатых трихом. Щитовидные волоски состоят из одной базальной эпидермальной клетки, одной клетки шейки и четырех секреторных клеток, увенчанных широким подкожным пространством. Головчатые были разделены на два подтипа в зависимости от длины стебля и особенностей головки. Короткостебельный состоял из одной базальной эпидермальной клетки, одной клетки шейки и одно(двух)клеточной секреторной головки, окруженной тонким подкожным пространством; эти волоски могут по-разному уходить в эпидермис или выступать на поверхность несущего их органа. Длинностебельные волоски состоят из одной базальной клетки, одно(двух)клеточного стебля и одной шаровидной секреторной головной клетки. Также наблюдались нежелезистые трихомы. Они были простыми, многоклеточными, однорядными с острой вершиной; диаметр клеток прогрессивно

уменьшался от основания к верхушке. Кутикула, как правило, гладкая и иногда характеризуется микрососочками, иногда они отсутствуют на базальных клетках. На листьях были щитковидные, короткие головчатые и простые нежелезистые волоски с обеих сторон, щитковидные встречались только на межжилковом участке пластинок, тогда как короткие головчатые присутствовали в основном на жилковой системе. На стеблях и прицветниках были обнаружены те же типы волосков, что и на листьях, но с меньшей плотностью. На исследованных цветочных мутовках повсеместно встречались три морфотипа трихом. Однако на чашечках было больше коротких головчатых головок. На трубке венчика преобладали щитковидные, тогда как на нижней губе выявлялись длинные головчатые и простые нежелезистые трихомы; клетки этих последних волосков были значительно шире клеток соответствующих волосков, встречающихся на вегетативных органах. Щитковидные трихомы продуцируют химически гетерогенные вещества с полисахаридными, флавоноидными и терпеновыми компонентами. Короткие и длинные головчатые продуцируют исключительно гидрофильный (мукополисахарид) и терпеновый секрет соответственно [9].

Анализ HS-SPME выявил в общей сложности 59 различных соединений. В частности, в профилях листьев и цветков было идентифицировано 39 и 45 соединений соответственно [8].

Микроморфологические исследования на дубровнике обыкновенном показали наличие железистых трихом, т.е., щитковидных и головчатых, типичных для семейства губоцветных. Строение обоих морфотипов соответствовало результатам предыдущих работ зарубежных исследований, на которые опирались сотрудники экспериментального Ботанического сада «G.E. Ghirardi», проведённых на вегетативных и репродуктивных органах. Щитковидные трихомы имеют четырёхклеточную секреторирующую головку; коротко- и длинностебельные трихомы обладали двуклеточной и одноклеточной головкой соответственно. Кроме того, простые, однорядные, нежелезистые трихомы, наблюдаемые здесь, были обнаружены в предыдущих исследованиях и определены как игольчатые волоски. Спорадическое присутствие кутикулярных выростов в виде микрососочков также было подтверждено. Характер распределения различных морфотипов трихом оказался согласующимся с литературными данными, в частности, в отношении исключительной встречаемости длинностебельных головчатых трихом на репродуктивных органах с особым упором на чашечку [9].

Работа по гистохимическому исследованию представляет собой первый вклад, в котором химическая природа секреторных продуктов была задокументирована с использованием методов цифровой световой микроскопии. Фактически, в щитковидных трихомах был подтверждён синтез сложной смеси секреторных продуктов за счёт совместного присутствия терпеновой, полисахаридной и полифенольной фракций. Эта гетерогенная секреция была также выделена в щитковидных трихомах других видов губоцветных. В отношении короткостебельных головчатых, мукополисахаридная секреция была задокументирована у большинства исследованных представителей семейства губоцветных. Гистохимические результаты в сочетании с оценкой характера распределения трихом позволили итальянским ботаникам сопоставить различные морфотипы с профилями выделения летучих веществ из листьев и цветков. С помощью этой работы, учёные убедились, что длинные головки представляют собой основные места секреции терпенов на цветочном уровне; кроме того, щитковидные трихомы, широко распространённые на всех поверхностях эпидермиса, также способствуют выработке летучих веществ на репродуктивных органах за счёт синергетического действия. На уровне стебля и листа производство и выделение терпенов связаны исключительно с активностью щитков. В этой работе удалось подчеркнуть хорошо известную важность признаков чашечки как отличитель-

ного таксономического признака Дубровников, уже установленных для других родов Яснотковых, например, Стахиса Шалфейного. Действительно, трихомы растений до сих пор представляют большой интерес для описаний и экспериментов ботаников. Ворсяной покров регулярно рассматриваются в современных таксономических исследованиях. В качестве простых морфологических инструментов трихомы полезны из-за их широкого распространения на поверхности растений и легкости их изучения. Кроме того, сравнительные морфологические данные могут быть ценными для эволюционных исследований и изучения физио-экологической роли, которую они играли [9].

Фитохимический анализ HS-SPME выявил более сложный качественный профиль цветов из-за наибольшего количества общих и эксклюзивных соединений. Сравнение с предыдущими исследованиями, посвященными ЛОС целевых видов, было затруднено из-за различных используемых аналитических методов. Были обнаружены или подтверждены ЛОС, обладающие умеренной инсектицидной активностью, противогрибковыми свойствами, а также выявлена привлекающая способность по отношению к жукам-амброзиям, переносчикам патогенных грибов. Хотя это действие, по-видимому, противоречит защитной роли, выброс такого соединения может быть «сигналом» для обнаружения присутствия вредителя и, в свою очередь, для предотвращения начала заболевания [9].

Мультидисциплинарный подход исследования итальянских ботаников позволил изобразить близкородственные виды, объединив морфологическую характеристику железистого ворсяного покрова с образованием летучих молекул. Работа позволила выявить три морфотипа трихом, каждый со своеобразным характером распределения на вегетативном и репродуктивном компонентах. Была задокументирована, как элемент новизны, гистохимическая природа секреторных продуктов с помощью методов цифровой световой микроскопии. Щитовидные и длинностебельные головчатые морфотипы трихом являются основными местами, где происходит секреция и высвобождение терпенов. Кроме того, впервые профиль выбросов ЛОС растений, культивируемых в Италии, был охарактеризован с помощью HS-SPME с доминирующими соединениями β -кариофиллена, γ -мууролена и β -кубебена. Корреляция фитохимических результатов с экологической ролью, приписываемой в литературе основным соединениям, позволила выдвинуть гипотезу о преобладающей защитной роли в растениях, и с сопутствующим потенциальным привлекательным действием на уровне цветка. Эта работа обогатила знания в микроморфологической, фитохимической и биоэкологической областях растительного наследия, сохранённого в Ботаническом саду Гирарди, в рамках проекта «Ботанический сад, фабрика молекул» [9].

Проанализировав научную работу сотрудников экспериментального Ботанического сада «G.E. Ghirardi», можно сделать вывод, что подобный четырёхуровневый исследовательский подход к изучению конкретного растения даёт исчерпывающую ботаническую характеристику дубровника дикого. Среди исследованных качеств этого растения, следует выделить его привлекательность внешнего вида, которую можно использовать в декоративных целях. При этом он является медоносом, обладает лекарственными свойствами, выделяет эфирные масла и содержит дубильные вещества.

Можно отметить, что подобные исследования, направленные на расширение знаний о химическом составе Дубровника Белого, проводились на территории Ставропольского края. В работе проверялась фармакологическая активность состава веществ Дубровника [7, 8].

В последнее время набирает популярность использование эфиромасличных растений в народном хозяйстве [1, 7]. Для изготовления лекарственных препаратов применяются все ча-

сти растения Дубровника Обыкновенного. Условия для выращивания Дубровника можно создать на территориях схожих по климатическим условиям его произрастания в России. Это ценное растение на основе которого возможно разрабатывать лекарственные препараты или бактерицидные вещества и средства для защиты сельхоз культур. На базе Уральского Государственного университета были проведены исследования по выращиванию экзотической эфиромасличной культуры – Пажитника Греческого [1]. Дубровник Дикий имеет схожие предпочтения к условиям произрастания, что и Пажитник Греческий. Следует провести исследования на предмет выращивания Дубровника Дикого в России.

Библиографический список

1. *Абрамчук А. В., Карпухин М. Ю., Сапарклычева С. Е.* Влияние площади питания на рост, развитие и продуктивность Пажитника Греческого в условиях интродукции на Среднем Урале // Вестник Курганской ГСХА. Курганская государственная сельскохозяйственная академия имени Т. С. Мальцева. 2020. № 4. С. 3-9.
2. Ботаническое описание Дубровника обыкновенного // Википедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Дубровник_обыкновенный.
3. Ботанический сад Гирарди//VV-Travel [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vv-travel.ru/tarticlle/orto-botanico-g-e-ghirardi>.
4. Ботанический сад Гирарди//Wiki [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ru.zahn-info-portal.de/wiki/Orto_Botanico_%22G.E._Ghirardi%22.
5. Ботаническое описание Дубровника обыкновенного // Здоровье [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://lektrava.ru/encyclopedia/dubrovnik-obyknovennyy/>.
6. *Климова К. Г., Тихонова А. И., Шпаков А. Э.* Динамика структуры популяций вида дубровник обыкновенный (*Teucrium chamaedrys* L.) в различных экологических условиях // Проблемы региональной экологии. Кубанский Государственный университет. 2009. С. 147-151.
7. *Рудакова Ю. Г.* Фармакогностическое изучение дубровника белого (*Teucrium rolium* L.) флоры Северного Кавказа: дисс. ... Пятигорский медико-фармацевтический институт. Пятигорск, 2015. 24 с.
8. *Старицына И. А.* Симбиоз мегаполиса и Ботанического сада на примере г. Екатеринбурга // Келлеровские чтения: материалы Национальной (с международным участием) научно-практической конференции, посвященной 145-летию со дня рождения академика, заслуженного деятеля науки РФ Б. А. Келлера и 130-летию со дня рождения профессора Б. М. Козо-Полянского, Воронеж, 28–29 апреля 2020 года. Воронеж: Изд-во Воронежского государственного аграрного университета им. Императора Петра I, 2020. С. 20-25.
9. *Giuliani C., Bottoni M., Ascrizzi R., Milani F., Spada A., Flamini G., Fico G.* Morphology and phytochemistry of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) cultivated at the Ghirardi Botanic Garden (Lombardy, Northern Italy) // *Flora*. 2021. Vol. 282. P. 151898.