

УДК 581.192

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ  
ВИДОВ ПОЛЫНЕЙ В КУЛЬТУРЕ БОТАНИЧЕСКОГО САДА  
ИМ. ПРОФ. Б.М. КОЗО-ПОЛЯНСКОГО  
ВОРОНЕЖСКОГО ГОСУНИВЕРСИТЕТА**

<sup>1</sup>Землянухина О.А., <sup>2</sup>Калаев В.Н., <sup>2</sup>Лепешкина Л.А., <sup>1</sup>Карпеченко К.А.,  
<sup>1</sup>Вепринцев В.Н., <sup>2</sup>Серикова В.И.

<sup>1</sup>ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции»,  
Воронеж, e-mail: victoria.semenova@gmail.com;

<sup>2</sup>Ботанический сад им. проф. Б.М. Козо-Полянского ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru

Проведен анализ результатов физиолого-биохимического исследования представителей рода полынь: полынь широколистная (*Artemisia litifolia* Ledeb.), полынь армянская (*Artemisia armeniaca* Lam.), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess.), полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) и полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris* L.), культивируемых в ботаническом саду им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета. Активность пероксидазы определяли в реакции окисления бензидина, рассчитывали удельную активность фермента, изоферментный анализ проводили по методу Девиса, количественное содержание белка определяли по методу Бредфорда. Выявлены закономерности распределения активности ферментов у видов полыни, определена активность пероксидазы, получены результаты изоферментного анализа. Установлены возможности использования пероксидазы в качестве маркера стрессового состояния энергетического метаболизма. Создана 5-балльная шкала устойчивости видов полыни в условиях культуры. Наиболее приспособленной к условиям культивирования является полынь обыкновенная, наименее – полынь беловойлочная.

**Ключевые слова:** распределение активности ферментов, изоферментный спектр, пероксидаза, адаптация

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS  
OF SOME SPECIES OF ARTEMISIA IN THE CULTURE OF BOTANICAL  
GARDEN OF VORONEZH STATE UNIVERSITY**

<sup>1</sup>Zemlyanuhina O.A., <sup>2</sup>Kalaev V.N., <sup>2</sup>Lepeshkina L.A., <sup>1</sup>Karpechenko K.A.,  
<sup>1</sup>Veprintsev V.N., <sup>2</sup>Serikova V.I.

<sup>1</sup>Research Institute of Forest Genetics and Plant Breeding, Voronezh,  
e-mail: victoria.semenova@gmail.com;

<sup>2</sup>Botanical garden of Voronezh state university by the name of professor  
B.M. Kozo-Polyansky, Voronezh, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru

The results of physiological and biochemical study of the genus *Artemisia* is analyzed. Some species are cultivated in the Botanical garden of the Voronezh state university. Among them *Artemisia latifolia* Ledeb., *Artemisia armeniaca* Lam., *Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess., *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia vulgaris* L. Peroxidase activity in the oxidation of benzidine is defined. The specific activity of enzyme is calculated. The isofermental analysis was performed by the method of Devis. Quantify the protein content is determined by the method of Bredford. The features of the distribution of enzyme activity in different species of *Artemisia* are founded. The results of the isofermental analysis are obtained. The possibilities of using of peroxidase as a stress marker in energy metabolism are established. The five-point scale of stability of the cultivated species of *Artemisia* is created. According to research the most sustainable species of cultivated *Artemisia* is *Artemisia vulgaris* L. and the least one is *Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess.

**Keywords:** distribution of enzyme activity, isozyme range, peroxidase, adaptation

Виды рода полынь (*Artemisia*) широко распространены в умеренных широтах Голарктики и давно используются как лекарственные, пищевые, пряно-ароматические, эфиромасличные и инсектицидные растения.

Во флоре Центрального Черноземья насчитывается 13 видов полыней, в том числе 8 видов, охраняемых на региональном и государственном уровне. Популяции их сокращаются из-за нарушения типичных местообитаний в результате выпаса скота, промышленной добычи мела и известня-

ка, отчуждения земель под строительство транспортных объектов и т.д.

В условиях ботанического сада на коллекциях и экспозициях природной флоры и растительности региона культивируются многочисленные виды рода полынь (*Artemisia*). Среди них особый интерес представляют редкие и хозяйственно значимые: полынь широколистная (*Artemisia litifolia* Ledeb.), полынь армянская (*Artemisia armeniaca* Lam.), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess.), полынь

эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) и полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris* L.).

**Целью работы** являлся сравнительный анализ метаболических процессов видов полыней региональной флоры в условиях культуры ботанического сада.

### Материалы и методы исследования

В работе изучались физиолого-биохимические особенности пяти видов полыней, культивируемых в ботаническом саду Воронежского госуниверситета:

1. Полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca*) – стелющийся полукустарничек, занесен в Красную книгу России, статус – 2 [7]. Эндемик бассейна Дона и Северского Донца. В Черноземье растет на меловых обнажениях юго-восточной части Белгородской области и юге Воронежской области. Посадочный материал растений мобилизован из природных местообитаний Богучарского района Воронежской области в 2006 году. Ранее культивируемые растения полыни беловойлочной выпали из коллекции. В культуре сохраняется около 5 лет. Цветет, но не дает всхожих семян.

2. Полынь армянская (*Artemisia armeniaca*). Редкий охраняемый в регионе вид [3]. Встречается по степным склонам, на опушках дубрав с карбонатной подпочвой. В культуре ботанического сада с 1962 года (посадочный материал репродукции заповедника «Галичья гора» Липецкой области). В коллекции сохраняется более 10 лет, но в отдельные годы жизненные показатели значительно снижены.

3. Полынь широколистная (*Artemisia latifolia*). Узвильный вид – занесен в региональные Красные книги [3]. Растет по разнотравным степям, опушкам степных дубрав, среди кустарников. В культуре ботанического сада с 1962 года (посадочный материал репродукции заповедника Галичья гора Липецкой области). На коллекционном участке хорошо разрастается вегетативно, ежегодно цветет и плодоносит.

В качестве контроля изучали физиолого-биохимические показатели растений наиболее эвриотопных и устойчивых видов – полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris*) и полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus*).

4. Полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) растет в прибрежных экотопах и по солонцеватым лугам [8]. В культуре ботанического сада с 1970 года. Посадочный материал выращен из семян, собранных в пойме реки Дон. В условиях коллекции устойчива, хорошо разрастается вегетативно, так как формирует длинное корневище.

5. Полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris* L.) – обычное широко распространенное сорно-луговое растение [8]. В культуре и на нарушенных местах ведет себя агрессивно, отмечается обильный самосев.

Активность пероксидазы определяли в гомогенатах тканей растений в реакции окисления бензидина [4]. Ферментативный препарат получали с помощью центрифугирования в течение 7 мин при 7000 об/мин, растертых со стеклом листьев в 0,1 М трис-НС1 буфере, рН 7,5, при комнатной температуре. Об активности пероксидазы судили по увеличению оптической плотности при 520 нм.

Расчет относительной общей активности проводили путем отнесения изменения оптической плотности на единицу времени (мин) в мл ферментативного препарата без учета коэффициента молярной экстинкции (именуется в дальнейшем «общая актив-

ность», ФЕ/мл). Удельную активность рассчитывали, относя общую активность к содержанию белка в 1 мл ферментативной жидкости (ФЕ/мг).

Изоферментный анализ пероксидазы проводили электрофоретически по стандартному методу Дэвиса в вертикальных пластинах ПААГ в окрашивающей смеси [9, 11] в нашей модификации [5] с использованием 50% спиртового раствора 0,1% бензидина, содержащего 6% ацетата натрия (рН 7,0) и 1% раствора перекиси водорода. Окраска в виде коричневых зон пероксидазы проявлялась в течение 30–60 мин, после чего гели высушивали на стеклянных пластинах, в целлофане, в растворе спирт: глицерин (1:1), а затем сканировали.

Количественное содержание белка выполнено по методу Брэдфорда [10].

### Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что все виды полыни в надземной части содержат каротин, алкалоиды, эфирное масло, флавоноиды, кумарины; в корнях – следы алкалоидов. Содержание эфирного масла в зелёной массе достигает 0,1–0,4% на сырую массу, или 0,25–0,8% на абсолютно сухую массу. В эфирном масле обнаружены сабинен (до 65%), мирцен (10%), сесквитерпеновая фракция (5%), *p*-метаоксикоричный альдегид (0,5%) и смола (15%), метилхавикол, оцимен, фелландрен. В настоящее время полыни привлекают внимание исследователей как каротинсодержащие растения.

Тем не менее до сих пор не изучалось распределение активности ферментов, в частности, пероксидазы у полыней разных видов, произрастающих в условиях культуры ботанического сада. Применение физиолого-биохимических методов имеет особое значение. Эпигенетика рассматривает не просто зависимость функционирования генов от последовательности нуклеотидов, но главным образом от химического окружения и взаимодействия его с хромосомами, от метилирования ДНК и др. [2]. В этой связи возникает вопрос о необходимости изучения не только белковых маркеров или изоферментов, важность которых очевидна, но и активности ферментов как одного из проявлений эпигенетики. Фермент, используемый в качестве генетического маркера, должен отвечать ряду требований: он должен быть полиморфным, должны быть изучены его генетический контроль, тканевая специфичность и др. Основной задачей работы был анализ активности пероксидазы (ПО; КФ 1.11.1.7), а также изоферментного спектра фермента с целью уточнения шкалы приспособленности вышеперечисленных видов полыни в культуре ботанического сада Воронежского госуниверситета.

Пероксидаза – один из наиболее распространенных ферментов растений, принимающий участие в ряде важных физиологических процессов, таких как адаптация к стрессовым факторам внешней среды, каталитическое окисление ряда органических соединений, дыхание, синтез лигнина. Выявлены широкие возможности использования данного фермента в качестве диагностического или маркерного реагента в иммуноферментном анализе [1].

Фермент широко используется при изучении генетического полиморфизма различных видов растений. Существование большого числа его изоформ определяет широкую специфичность к окисляемому субстрату и разнообразие выполняемых им функций.

Результаты измерения активности пероксидазы и определения количества растворимого общего белка представлены на рис. 1 и в табл. 1.

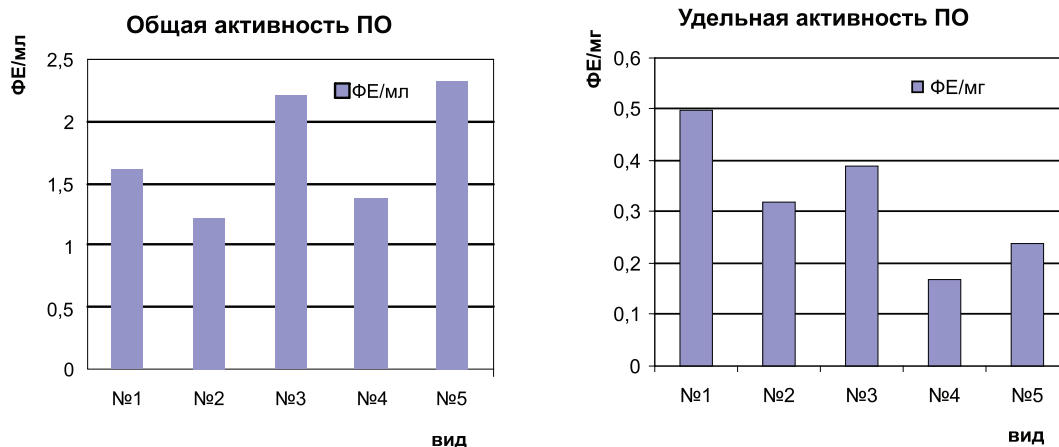


Рис. 1. Распределение общей и удельной активности пероксидазы (ПО) у пяти видов полыней. Обозначения по оси абсцисс: 1 – полынь беловойлочная; 2 – полынь армянская; 3 – полынь широколистная; 4 – полынь обыкновенная; 5 – полынь эстрагон

**Таблица 1**

Количество общего растворимого белка у пяти видов полыней (по методу Брэдфорда)

№ п/п	Вид полыни	Белок, мг/мл
1	Полынь беловойлочная	3,23
2	Полынь армянская	3,82
3	Полынь широколистная	5,71
4	Полынь обыкновенная	8,21
5	Полынь эстрагон	9,80

Приведенные данные по общей активности фермента демонстрируют достаточно хаотичное ее распределение между видами полыней. Однако отнесение величин активности к содержанию белка (мг/мл) приводит результаты к более четкой картине. В результате степень приспособления видов полыней в культуре ботанического сада можно выразить такой последовательностью (по мере улучшения адаптации): полынь беловойлочная < полынь широколистная < полынь армянская < полынь эстрагон < полынь обыкновенная. Электрофоретические данные представлены на рис. 2 и в табл. 2.

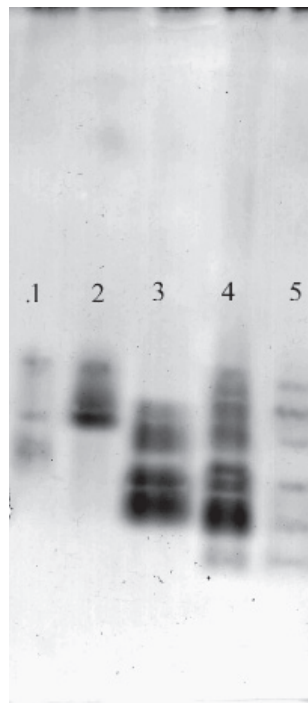


Рис. 2. Изоферментный спектр пероксидазы пяти видов полыней. Обозначения: 1 – полынь беловойлочная; 2 – полынь армянская; 3 – полынь широколистная; 4 – полынь обыкновенная; 5 – полынь эстрагон

Таблица 2

Распределение изоформ пероксидазной активности у пяти видов полыней в пластинах ПААГ-геля по электрофоретической подвижности ( $R_f$ )

$R_f$	Полынь беловойлочная	Полынь армянская	Полынь широколистная	Полынь обыкновенная	Полынь эстрагон
0.53					+
0.54	+	+		+	
0.56				+	+
0.57		+	+	+	+
0.61	+	+			
0.62			+	+	
0.64	+				
0.67				+	+
0.69			+	+	
0.73			+	+	+
0.82				+	+

Результаты электрофоретических исследований указывают скорее на видоспецифичность пероксидазной активности, чем на степень приспособления к почвам ботанического сада. Можно отметить близкое родство (сходство) изоферментных спектров полыни обыкновенной и полыни эстрагон: оба вида имеют по 5 общих изоформ, тогда как остальные три вида – по 1–2 изоформ фермента.

На основании полученных результатов нами выявлена пятибалльная шкала приспособленности видов полыней к условиям культуры ботанического сада Воронежского госуниверситета (табл. 3).

Таблица 3

Пятибалльная шкала приспособленности пяти видов полыней

Виды полыней	Балл	Характеристика приспособленности растений
Полынь беловойлочная	1	Находятся в условиях сильного стресса
Полынь армянская	2	Находятся в условиях слабого стресса
Полынь широколистная	3	Приспособленные
Полынь эстрагон	4	Хорошо приспособленные
Полынь обыкновенная	5	Максимально приспособленные

Таким образом, у пяти видов полыней активность фермента пероксидазы и количество общего растворимого белка в определенной степени коррелируют с их устойчивостью в условиях культуры ботанического сада. В соответствии с этим пяти видам полыней был присвоен балл приспособленности к условиям интродукционного эксперимента: 5 баллов – полынь обыкновенная, 4 балла – полынь эстрагон; 3 балла – полынь широколистная, 2 балла – полынь армянская, 1 балл – полынь беловойлочная.

Отмечено, чем ниже активность фермента, в данном случае – пероксидазы, отвечающего за адаптацию к стрессовым условиям, тем лучше растение чувствует себя на данном типе почвы, в данных условиях произрастания. Следует отметить, что удельная активность фермента пероксидазы у полыни армянской и полыни широколистной имеет близкие значения, 0,39 и 0,32 ФЕ/мг соответственно. Для полыни обыкновенной и полыни эстрагон также выявлены близкие значения пероксидазы, 0,24 и 0,17 ФЕ/мг соответственно.

### Заключение

Одним из ранних ответов организма на стрессирующие факторы является накопление перекиси водорода и других активных форм кислорода, при этом происходит активация генов активности пероксидазы, выражающаяся в изменении активности фермента и количестве его изоформ в ту или иную сторону [5]. Наши исследования подтвердили регуляторную функцию пероксидазы в адаптивных процессах видов полыней. Из результатов работы следует, что фермент пероксидаза наряду с другими может служить биохимическим маркером стрессового состояния энергетического метаболизма. Достоинством пероксидазного маркера является простота анализа и возможность его широкого применения.

Работа выполнена в рамках и при поддержке государственного контракта на выполнение научно-исследовательских



и опытно-конструкторских работ федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» № 16.518.11.7099.

**Список литературы**

1. Использование пероксидазы и глутаматдегидрогеназы в качестве биохимических маркеров в биотехнологических исследованиях на картофеле / И.С. Витал, О.С. Мелик Саркисов, В.А. Аветисов, И.Г. Дубровский // Докл. ВАСХНИЛ. – 1989. – Т. 10. – С. 14–15.
2. Гиббс У. «Тенева» часть генома: сокровища на свалке // В мире науки. – 2004. – №2. – С. 21–27.
3. Голицын С.В., Доронин Ю.А. Реликтовая флора и растительность // Памятники природы Воронежской области. – Воронеж, 1970. – С. 107–118.
4. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие для вузов. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1996. – 186 с.
5. Активность и изозимный спектр пероксидазы клонов карельской березы, размноженных in vitro / О.А. Землянухина, О.С. Машкина, И.В. Саблина, Ю.Н. Исаков, А.Т. Епринцев // Межрегион. сб. науч. работ. Вып. 5. ВГУ. – Воронеж, 2003. – С. 46–52.
6. Землянухина О.А., Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Адаптация сахарной свеклы in vitro к условиям засоления // Биология клеток растений in vitro и биотехнология: материалы IX Междунар. науч. конф. (Звенигород, 8–12 сент. 2008 г.). – Звенигород, 2008. – С. 132.
7. Красная книга Российской Федерации (растения, грибы). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.
8. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. – 10-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. – М.: Мир, 1971. – 248 с.
10. Bradford V.V. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, №4. – P. 417–422.
11. Davis B.J. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – Vol. 121. – P. 404–427.

**References**

1. Vital I.S., Melik Sarkisov O.S., Avetisov V.A., Dubrovskij I.G. *Doklady VASHNIL – Reports of Agricultural Sciences*, 1989, Vol. 10, pp. 14–15.

2. Gibbs U. «Tenevaja» chast' genoma: sokroviwa na svalke – «Shadow» part of genome: treasures on a dump. In the world of science, 2004. no 2, pp. 21–27.

3. Golicyn S.V., Doronin Ju.A. Reliktovaja flora i rastitel'nost' (Relict flora and vegetation: Monuments of nature of the Voronezh area), Voronezh, 1970.

4. Zemljanuhin A.A., Zemljanuhin L.A. *Bol'shoj praktikum po fiziologii i biohimii rastenij* [Large practical work on physiology and biochemistry of plants]. Voronezh, VSU Publ., 1996. 186 p.

5. Zemljanuhina O.A., Mashkina O.S., Sablina I.V., Isakov Ju.N., Eprincev A.T. *Mezhregional'nyj sbornik nauchnyh rabot «Aktivnost' i izozimnyj spektr peroksidazy klonov karel'skoj berezy, razmnozhenykh in vitro» (Inter-regional collection of scientific works «Activity and spectrum of peroxidase izozimny Karelian birch clones, propagated in vitro»)*. Voronezh, 2003, pp. 46–52.

6. Zemljanuhina O.A., Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P. *Adaptacija saharnoj svekly in vitro k uslovijam zasolenija* [Adaptation of sugar beet in vitro to conditions of salinity: Biology of plant cells in vitro and Biotechnology: Proceedings of the Fourth International Conference of Scientists]. Zvenigorod, 2008. p. 132.

7. *Krasnaja kniga Rossijskoj Federacii (rastenija, griby)* [The Red Book of Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow, KMK Publ., 2008. 855 p.

8. Maevskij P.F. *Flora srednej polosy evropejskoj chasti Rossii* [The flora of central European part of Russia]. Moscow, 2006. 600 p.

9. Maurer G. *Disk-jelektroforez* [Disc electrophoresis]. Moscow, Mir Publ., 1971. 222 p.

10. Bradford V.V. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. no. 4. pp. 417–422.

11. Davis B.J. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121. pp. 404–427.

**Рецензенты:**

Ершова А.Н., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии растений и животных естественно-географического факультета ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», г. Воронеж;

Корнеева О.С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и биохимии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.