

УДК 581.82; 615.322

ГИСТОХИМИЯ ТРИХОМ ОФИЦИОНАЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE

К.Н. Разаренова^{1*}, Е.В. Бабушкина¹, П.Д. Смирнов², О.В. Костина³,
Л.Е. Муравник³

Резюме. В настоящей работе методами световой микроскопии и гистохимии исследованы железистые трихомы, локализованные на поверхности цветков некоторых официальных представителей семейства Asteraceae. Получены данные по морфологии и размерам железистых трихом изученных видов. Обнаружено, что секреторные структуры всех исследуемых видов продуцируют терпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, полифенолы. Показана возможность использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений.

Ключевые слова: Asteraceae, железистые трихомы, секреторные структуры, гистохимия.

HYSTOCHEMISTRY OF GLANDULAR TRICHOMES OF MEDICINAL PLANTS FROM ASTERACEAE

K.N. Razaryonova^{1*}, E.V. Babushkina¹, P.D. Smirnov², O.V. Kostina³, L.E. Muravnik³

Abstract. Glandular trichomes localized on the flowers of some medicinal species of Asteraceae were studied by light microscopy and histochemistry. The trichome morphology and dimensions are presented in the text. The secretory structures have been shown to contain phenolic substances, terpenoids, sesquiterpene lactones. Histochemistry is a perspective method to analyze glandular trichomes of medicinal plants containing essential oil.

Keywords: Asteraceae, glandular trichomes, secretory structures, histochemistry.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9

3 – ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 2

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – Saint-Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., Saint-Petersburg, 199034, Russia

3 – Komarov Botanical Institute, 2, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: ksenia.rasarenova@pharminnotech.com

Тел.: 8 (911) 007 61 47

ВВЕДЕНИЕ

Эфиромасличные лекарственные растения широко применяются в пищевой и парфюмерной промышленности, а также в фармацевтической практике для получения медицинских препаратов [1, 2]. Для определения подлинности лекарственного растительного сырья большое значение имеет микроскопический анализ [3, 4]. До настоящего времени в микроскопических исследованиях лекарственного сырья практически не применяли гистохимические тесты, с помощью которых можно установить состав содержащихся в нем классов химических соединений [4]. В представленной работе изучены возможности использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений, относящихся к семейству Asteraceae.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объектов исследования использовали пять представителей семейства Asteraceae: *Matricaria recutita* L., *Achillea millefolium* L., *Arnica montana* L., *Tanacetum vulgare* L., *Artemisia absinthium* L. Растения были собраны на территории питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район) летом 2015 года. У видов семейства Asteraceae исследовали трубчатые и ложноязычковые цветки. Для исследования использовали цветки, срезанные с живых растений.

Световая микроскопия. Цветки смотрели целыми. Наблюдения осуществляли на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Germany) с видеокамерой AxioCam RMc5 (Carl Zeiss, Germany).

Гистохимические тесты. Терпены определяли при взаимодействии с реактивом НАДИ по фиолетовому окрашиванию [5]. Сесквитерпеновые лактоны под воздействием концентрированной соляной кислоты приобретали оранжевую окраску [6]. Полифенолы обнаруживали в реакции с толуидиновым синим по зеленому окрашиванию [7].

Методики приготовления реактивов. Реактив НАДИ получали, смешивая 0,5 мл 10% α-нафтола в 40% спирте, 0,5 мл 1% хлористого диметилпарафенилендиамина и 49 мл 0,05 М фосфатного буфера с рН 7,2 [5]. В качестве реактива на полифенолы использовали 0,05% водный раствор толуидинового синего.

Образцы выдерживали в соответствующем реактиве в течение 5 мин, избыток реактива удаляли фильтровальной бумагой, а затем помещали на предметное стекло в каплю воды.

Морфометрия и статистическая обработка результатов. Измерение трихом производили в программе ZEN 2.3. (Carl Zeiss, Germany). Измеряли диаметр секреторной головки (в самой широкой части) и высоту трихомы. При измерении высоты трихомы учитывали высоту секреторной головки (с субкутикулярным пространством) и высоту ножки. Выборка включала 10 измерений, статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение железистых трихом представителей семейства Asteraceae. Известно, что железистые трихомы, характерные для семейства Asteraceae, достаточно однообразны в отличие от нежелезистых, представленных многочисленными морфологическими типами [8]. Среди железистых трихом наиболее обычным является двурядный тип, обнаруженный у многих представителей семейства [8–13]. Он представляет собой структуру, состоящую из нескольких лежащих друг на друге пар клеток. В трихоме верхние 2–3 слоя клеток являются секреторными, а нижние выполняют функцию ножки.

Ниже и в таблице 1 приводятся полученные нами данные по морфологии и размерам железистых трихом у видов Asteraceae. У *Matricaria recutita*, *Achillea millefolium*, *Tanacetum vulgare* и *Artemisia absinthium* железистые трихомы состоят из 10 клеток: одна пара базальных клеток, одна пара клеток ножки и три пары секреторных клеток (рисунки 1–4, А). У *Arnica montana* железистые трихомы включают пару базальных клеток, пару клеток ножки и шесть пар секреторных клеток (рисунок 5А). Среди изученных в настоящей работе видов Asteraceae самые крупные железистые трихомы отмечены у *A. millefolium*, наименьшие – у *A. montana*.

У видов Asteraceae на поверхности секреторной головки железистых трихом формируется субкутикулярная полость, в ней накапливается секрет, кото-

рый выводится наружу в случае ее разрыва [8–10]. У *M. recutita*, *A. millefolium*, *T. vulgare* и *A. absinthium* субкутикулярное пространство образуется над несколькими рядами секреторных клеток, в то время как у *A. montana* только верхние секреторные клетки участвуют в ее образовании (рисунки 1–5, А).

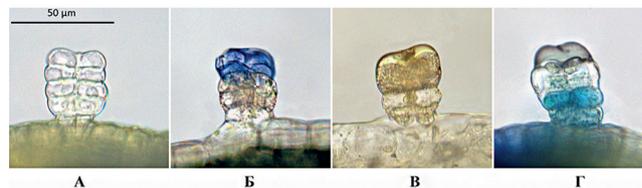


Рисунок 1. Общий вид железистых трихом *Matricaria recutita* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

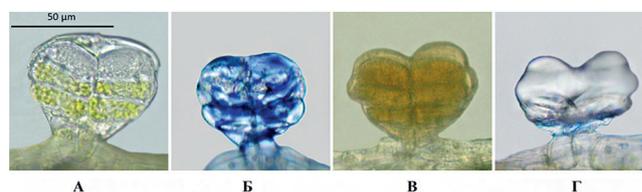


Рисунок 2. Общий вид железистых трихом *Achillea millefolium* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

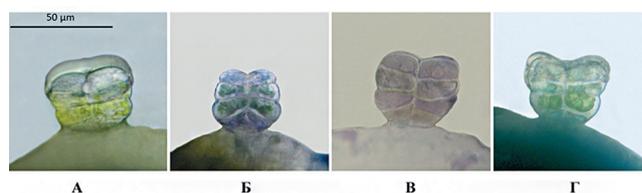


Рисунок 3. Общий вид железистых трихом *Artemisia absinthium* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

Таблица 1.

Размеры железистых трихом изучаемых видов Asteraceae

Вид	d	h
<i>Matricaria recutita</i>	39,3±2,7	49,6±4,6
<i>Arnica montana</i>	28,5±2,7	63,5±5,0
<i>Artemisia absinthium</i>	48,4±3,4	45,5±4,1
<i>Achillea millefolium</i>	76,2±3,7	75,2±1,5
<i>Tanacetum vulgare</i>	59,0±5,6	46,2±5,2

Примечание: d – диаметр секреторной головки, мкм; h – высота железки (с учетом секреторной головки, субкутикулярного пространства и ножки), мкм.

Гистохимия железистых трихом. Наши исследования показали характерное окрашивание клеток разных типов, которое является результатом взаимо-

действия реактивов с детектируемыми компонентами и приводит к их специфическому связыванию [14].

Результаты проведения гистохимических реакций для выявления вторичных метаболитов в трихомах представителей семейства Asteraceae представлены в таблице 2 и на рисунках 1–5.

Таблица 2.

Выявление вторичных метаболитов гистохимическими методами в трихомах представителей семейства Asteraceae

Выявленные вещества / вид	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Arnica montana</i>	<i>Tanacetum vulgare</i>	<i>Artemisia absinthium</i>
Терпеноиды	++	+	++	+	+
Сесквитерпеновые лактоны	+	++	+	+	+
Полифенолы	++	-	+	-	+

Примечание: «-» – реакция отрицательная; «+» – реакция положительная, эффект слабо выражен; «++» – реакция положительная, эффект сильно выражен.

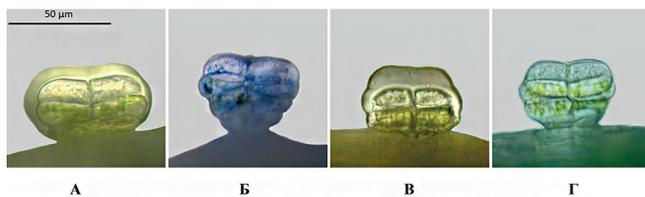


Рисунок 4. Общий вид железистых трихом *Tanacetum vulgare* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

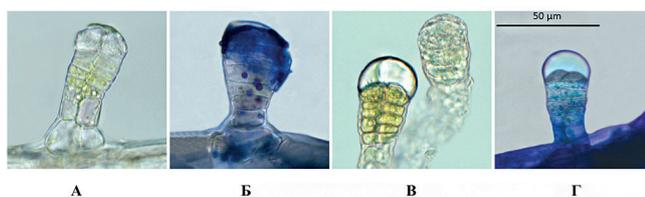


Рисунок 5. Общий вид железистых трихом *Arnica montana* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

Синее окрашивание клеток секреторной головки под действием реактива НАДИ показало присутствие терпеноидов в железистых трихомах изученных видов Asteraceae (рисунки 1–5, Б). Наличие полифенолов в железистых трихомах *M. recutita*, *A. absinthium* и *A. montana* было подтверждено их зеленой окраской под действием толуидинового синего (рисунки 1Г, 3Г, 5Г). Разные клетки секреторной головки показали отличное друг от друга окрашивание в этой реакции,

что свидетельствует о разной концентрации содержащихся в них фенольных соединений. Положительная реакция с концентрированной соляной кислотой демонстрирует присутствие сесквитерпеновых лактонов в составе клеток секреторной головки железистых трихом у изученных нами видов Asteraceae (рисунки 1–5, В).

Таким образом, гистохимические тесты выявили локализацию в секреторных структурах изучаемых Asteraceae терпеноидов, а также сесквитерпеновых лактонов. Кроме того, в железистых трихомах *M. recutita*, *A. absinthium* и *A. montana* обнаружены полифенолы. Полученные результаты согласуются с литературными данными по вторичным метаболитам у изучаемых видов Asteraceae. Так, фенольные соединения (флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты) были идентифицированы в соцветиях *M. recutita* [15], *A. montana* [16–18], в надземной части *A. millefolium* [19], *T. vulgare* [20, 21] и *A. absinthium* [18, 22]. Сесквитерпеновые лактоны были выделены из соцветий *M. recutita* [23, 24], *A. montana* [16, 25], из надземной части *A. millefolium* [26], *T. vulgare* [27], *A. absinthium* [22, 28, 29]. Эфирное масло всех изучаемых Asteraceae включает терпеноидные соединения, среди которых у *M. recutita* [30, 31] и *A. montana* [32] преобладают сесквитерпеноиды, а у *T. vulgare* [20, 33] и *A. absinthium* [22] доминируют монотерпеноиды. В состав эфирного масла *A. millefolium* входят монотерпеноиды и сесквитерпеноиды (содержание сесквитерпеноидов может быть от следовых количеств до 40% в зависимости от хемотипа) [34]. По данным Andreucci [10], в железках *M. recutita* гистохимическими методами ранее также, как и в нашей работе, были обнаружены терпеноиды и сесквитерпеновые лактоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено сравнительное изучение секреторных структур некоторых официальных представителей семейств Asteraceae методами световой микроскопии в сочетании с гистохимическими тестами. На поверхности трубчатых и ложноязычковых цветков у всех изученных видов обнаружены морфологически различные железистые трихомы. Проведенные гистохимические тесты продемонстрировали, что секреторные структуры всех исследуемых видов Asteraceae продуцируют терпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, полифенолы. Таким образом, показана возможность использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «ОПТЭК» (грант поддержки молодых ученых ведущих высших учебных заведений и научных исследовательских центров 2014 года).

ЛИТЕРАТУРА

1. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Сем. Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. 352 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Сем. Hippuridaceae – Lobeliaceae. – СПб.: Наука, 1991. 200 с.
3. Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М. 2009. 295 с.
4. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. – М. 1989. 400 с.
5. R. David, J.-P. Carde. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophilles du pin maritime au moyen du reactif nadi // Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1964. V. 258. Is. 12. P. 1338–1340.
6. T.A. Geissmann, T.S. Griffin. Sesquiterpene lactones: acid-catalysed color reactions as an aid in structure determination // Phytochemistry. 1971. V. 10. Is. 10. P. 2475–2485.
7. M. Gutmann. Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semi-thin sections of plant tissue // Journal of Microscopy. 1995. V. 179. Is. 3. P. 277–281.
8. D. Ciccarelli, F. Garbari, A.M. Pagni. Glandular hairs of the ovary: a helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy? // Annales Botanici Fennici. 2007. V. 44. № 1. P. 1–7.
9. C.A. Figueredo, M. Salomé, S. Pais. Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* // Annals of Botany. 1994. V. 74. Is. 2. P. 179–190.
10. A.C. Andreucci, D. Ciccarelli, I. Desideri, A.M. Pagni. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry // Annales Botanici Fennici. 2008. V. 45. № 1. P. 11–18.
11. M.Q. Hayat, M. Ashraf, M.A. Khan, G. Yasmin, N. Shaheen, S. Jabeen. Diversity of foliar trichomes and their systematic implications in the genus *Artemisia* (Asteraceae) // International Journal of Agriculture and Biology. 2009. V. 11. № 5. P. 542–546.
12. K.K. Guerreiro, V. Bobek, V.L.P. Santos, C.R.C. Franco, J.P. Paula, P.V. Farago, J.M. Budel. Análise farmacobotânica de folha e caule de *Tanacetum vulgare* (L.) // Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2015. V. 18. № 1. P. 89–95.
13. M. Salehi, G. Karimzadeh, M.R. Naghavi, H.N. Badi, S.R. Monfared. Comparative assessment of five Iranian *Artemisia* species in view of glandular trichomes, using sem technique // 4th National Congress on Medicinal Plants. 12–13 May 2015. Tehran-Iran. P. 369.
14. M. Chwil, R. Nurzyńska-Wierdak, S. Chwil, R. Matraszek, J. Neugebauerová. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in *Melissa officinalis* L. leaf epidermis // Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 2016. Is. 15(3). P. 153–172.
15. O. Singh, Z. Khanam, N. Misra, M.K. Srivastava. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview // Pharmacognosy Review. 2011. V. 5. Is. 9. P. 82–95.
16. G. Willuhn. *Arnica montana* L. – Porträt einer Arzneipflanze // Pharmazeutische Zeitung. 1991. H. 136. S. 2453–2468.
17. M. Ganzera, C. Egger, C. Zidorn, H. Stuppner. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography // Analytica Chimica Acta. 2008. V. 614. Is. 2. P. 196–200.
18. O. Craciunescu, D. Constantin, A. Gaspar, L. Toma, E. Utoiu, L. Moldovan. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts // Chemistry Central Journal. 2012. V. 6. P. 97.
19. M.I. Dias, L. Barros, M. Duenas, E. Pereira, A.M. Carvalho, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, C. Santos-Buelga, I.C.F. Ferreira. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction // Food Chemistry. 2013. V. 141. Is. 4. P. 4152–4160.
20. M. Keskitalo, E. Pehu, J.E. Simon. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes // Biochemical Systematics and Ecology. 2001. V. 29. Is. 3. P. 267–285.
21. M. Juan-Badaturuge, S. Habtemariam, C. Jackson, M.J. Thomas. Antioxidant principles of *Tanacetum vulgare* L. aerial parts // Natural Product Communications. 2009. V. 4. Is. 11. P. 1561–1564.
22. H.T. Nguyen, Z.É. Németh. Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2016. V. 3. Is. 4. P. 143–150.
23. C. Tschiggerl, F. Bucar. Guaianolides and volatile compounds in chamomile tea // Plant Foods for Human Nutrition. 2012. V. 67. Is. 2. P. 129–135.
24. M. Flemming, B. Kraus, A. Rasclé, G. Jürgenliemk, S. Fuchs, R. Fürst, J. Heilmann. Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: comparison with chamazulene // Fitoterapia. 2015. V. 106. P. 122–128.
25. J. Staneva, P. Denkova, M. Todorova, L. Evstatieva. Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ¹H NMR spectroscopy // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011. V. 54. Is. 1. P. 94–99.
26. A. Ulubelen, S. Öksüz, A. Schuster. A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* // Phytochemistry. 1990. V. 29. № 12. P. 3948–3949.
27. J.F. Sanz, J.A. Marco. NMR studies of tatrudin A and some related sesquiterpene lactones from *Tanacetum vulgare* // Journal of Natural Products. 1991. V. 54. № 2. P. 591–596.
28. A. Turak, S.-P. Shi, Y. Jiang, P.-F. Tu. Dimeric guaianolides from *Artemisia absinthium* // Phytochemistry. 2014. V. 105. P. 109–114.
29. L.M. Silveira de Almeida, L.S. Aleixo de Carvalho, M.C. Gazolla, P.L. Silva Pinto, M.P. Nascimento da Silva, J. De Moraes, F.A.A. Da Silva. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016. 9 p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9521349> (дата обращения 10.05.2017).
30. J.A. Pino, F. Bayat, R. Marbot, J. Aguero. Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Iran // Journal of Essential Oil Research. 2002. V. 14. Is. 6. P. 407–408.
31. A. Pirzad, H. Alyari, M.R. Shakiba, S. Zeh-tab-Salmasi, A. Mohammadi. Essential oil content and composition of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes // Journal of Agronomy. 2006. V. 5. Is. 3. P. 451–455.
32. R. Kowalski, D. Sugier, P. Sugier, B. Kołodziej. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry // Industrial Crops and Products. 2015. V. 76. P. 857–865.
33. M.L. Mureşan, I. Oniga, C. Georgescu, R. Paltinean, F. Gligor, M.T. Crăciunaş, R. Oprean. Botanical and phytochemical studies on *Tanacetum vulgare* L. from Transylvania // Acta Medica Transilvanica. 2014. V. 2. N. 4. P. 300–302.
34. D. Mockute, A. Judzentiene. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania // Biochemical Systematics and Ecology. 2003. V. 31. Is. 9. P. 1033–1045.