

О.О. ОЛІЙНИК¹, А.А. КЛЮВАДЕНКО¹, А.Ф. ЛІХАНОВ¹,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК¹, В.І. ЧИЖАНЬКОВА²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041 м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

² Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1

ОСОБЛИВОСТІ НАГРОМАДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК В ЕКСПЛАНТАТАХ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ В УМОВАХ *IN VITRO*

Досліджено характер дифузії вторинних метаболітів троянди ефіроолійної у живильне середовище. Проведено гістохімічний аналіз пагонів інтактних рослин та первинних експлантатів на вміст катехінів і конденсованих танінів. Установлено, що синтез фенольних сполук найактивніше відбувається у живих тканинах первинної кори і серцевинних променах однорічних пагонів, де їх концентрація у 15–18 разів перевищує таку в клітинах склеренхіми та флоєми. Найактивніше фенольні сполуки виділялися первинними експлантатами сорту Лада, менш активно — сорту Лань. Показано, що інтенсивність виділень фенолів зі стебла у живильне середовище має просторову тканинну неоднорідність, топологічно пов'язану з розташуванням вегетативних бруньок. З'ясовано, що найактивнішими у цьому відношенні є зони первинної кори, які розташовані безпосередньо під брунькою. Встановлено, що інтенсивність виділення вторинних метаболітів залежить від сорту троянди ефіроолійної, радіального розміру експлантата і ступеня його здерев'яніння.

Ключові слова: фенольні сполуки, вторинні метаболіти, троянда ефіроолійна, культура *in vitro*.

Останніми десятиліттями активно вивчають механізми окиснення клітинних метаболітів і роль вільних радикалів у живих системах [6, 9, 10]. Відомо багато природних речовин (каротиноїди, токоферолі і поліфеноли), які відіграють важливу роль у захисті клітин, репарації і регенерації тканин та органів рослин при мікроклональному розмноженні [1, 2]. Троянда ефіроолійна (*Rosa damascena* Mill.) належить до рослин, які містять велику кількість вторинних метаболітів. Фітохімічним аналізом в ароматичній композиції пелюсток троянди ефіроолійної визначено 5 основних складових: вуглеводні (сесквітерпен фарнезол), спирти (терпени, такі як гераніол, нерол, і цитронелол), складні ефіри (гераніл ацетат), ароматичні прості ефіри (бензил метиловий ефір та метол-евгенол), альдегіди аліфатичних ланцюгів. У листках представників родини *Rosaceae* Juss. синтезуються біологічно активні сполуки фенольної природи: аглікони флавоноїдів — кемпферол і кверцетин та їх

глікозиди, пірокатехін, пірогалол, евгенол, проціанідини, основним з яких вважають епікатехін [9]. У молодих стеблах виявлено галову і ферулову кислоти, епікатехін, галатанін та димери проціанідинів. У тканинах здерев'янілих стебел накопичуються флаво-3-ол(-)-епікатехін, мономери, димери і полімери проціанідинів.

Фенольні сполуки, зокрема катехіни і таніни, здатні захищати травмовані та прилеглі до них тканини від вільних радикалів, які утворюються внаслідок активного дихання клітин. Під впливом підвищеної дози УФ-випромінювання клітини троянд накопичують приблизно в 15 разів більше флавоноїдів і здатні утворити вдвічі більшу кількість ДНК. Окиснення поліфенолів призводить до утворення сполук, які гальмують ростові процеси та ускладнюють регенерацію тканин. Інтерес до накопичення поліфенолів у тканинах рослин роду *Rosa* L. пояснюється їх значним впливом на регенераційні процеси в культурі *in vitro* [10].

Мета роботи — визначити місце локалізації та динаміку синтезу фенольних сполук в експлантатах троянди ефіроолійної у культурі *in vitro*.

© О.О. ОЛІЙНИК, А.А. КЛЮВАДЕНКО, А.Ф. ЛІХАНОВ,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, В.І. ЧИЖАНЬКОВА, 2017

Матеріал та методи

Введення рослин у культуру *in vitro* проводили у квітні—травні та серпні—вересні. Для досліджень використовували пагони інтактних рослин троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада та Радуга (селекція Інституту ефіроолійних і лікарських рослин НААН України) [8—10] без морфологічних відхилень, тератогенезу, фізіологічних аномалій та ознак інфекційних процесів. Первинними експлантатами були однорічні пагони першого, другого і третього порядків з 1-2 вузловими бруньками. Пагони нарізали на фрагменти завдовжки 3—5 см, які відмивали протягом 30 хв у мильному розчині і промивали проточною водою. Всі наступні

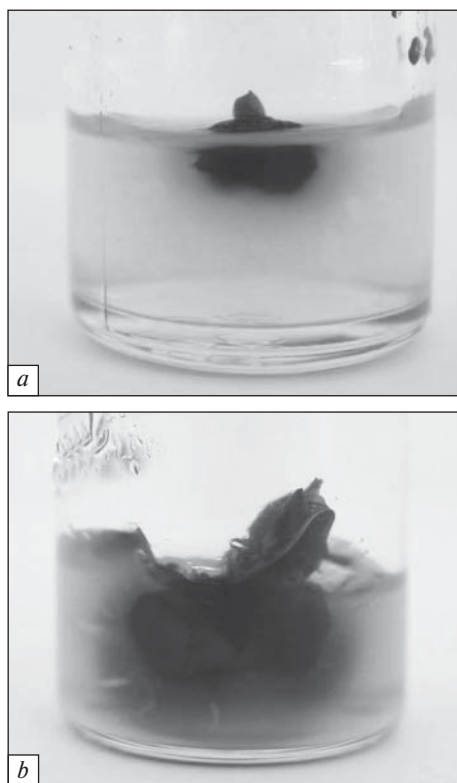


Рис. 1. Виділення та дифузія вторинних метаболітів експлантатами троянди ефіроолійної: *a* — сорт Лань; *b* — сорт Лада

Fig. 1. Segregation and diffusion of secondary metabolites by explants of *Rosa damascena* Mill: *a* — Lan variety; *b* — Lada variety

маніпуляції проводили в ламінарному боксі. Експлантати стерилізували у 70 % етанолі (60 с) і 0,1 % розчині $HgCl_2$ (5—10 хв). Пагони тричі відмивали від стериліантів стерильною водою (по 10 хв). Простерилізовані пагони розрізали на фрагменти завдовжки 1,5—2,0 см з 1-2 бруньками. Для введення в культуру *in vitro* використовували базове живильне середовище (ЖС) за прописом Мурасіге і Скуга. Експлантати культивували за температури (24 ± 2) °С, вологості повітря 65—70 %, освітленні 2,0—3,0 клк з фотоперіодом 16 год.

Загальний вміст фенольних сполук у рослинному матеріалі визначали спектрофотометричним методом, використовуючи реактив Фоліна—Чокольтеу. Калібрувальний графік будували по галовій кислоті. Цитологічний аналіз стебел проводили на поперечних зрізах з використанням мікроскопа Nikon Eclipse E-200. Фотодокументацію матеріалів здійснювали за допомогою програми Camera Control Pro-2.

Результати та обговорення

Пагони троянди ефіроолійної, які відбирали для формування експлантатів, після стерилізації і хірургічних маніпуляцій вводили в культуру *in vitro* для отримання рослин-регенерантів. На підібраних нами живильних середовищах за 15 діб основа експлантатів темніла і ЖС набували темного забарвлення, що пов'язано з інтенсивним виділенням вторинних метаболітів з тканин стебел (рис. 1). Дифузія сполук, які виділялися рослинними тканинами у ЖС, мала відносно рівномірний характер, проте інтенсивність процесу залежала від сортів троянди, радіального розміру експлантата та ступеня його здрев'яніння. Найактивніше фенольні сполуки виділялися експлантатами сорту Лада. Метаболіти, які потрапляли у ЖС, мали жовто-коричневе забарвлення, яке з часом темнішало.

Дані щодо характеру дифузії фенольних сполук за інтенсивністю забарвлення ЖС наведено на рис. 2. Установлено, що метаболіти, які виділяються експлантатами сорту Лада, дифундують досить активно, а характер їх розподілу описується лінійною функцією (рис. 2,

а), повільніше рухаються метаболіти сорту Лань, характер їх розподілу описується ступеневою функцією (рис. 2, в).

За умов однакової структури твердого ЖС інтенсивність забарвлення гелю вторинними метаболітами експлантатів залежала від кількості речовин та їх якісного складу. Більшість фенольних сполук на початкових етапах фенілпропановидного синтезу являють собою безбарвні оксикоричні кислоти, котрі завдяки подальшому ферментативному каталізу перетворюються на складніші фенольні сполуки, зокрема катехіни і таніни. Останні мають антиоксидантні властивості і здатні захищати травмовані та прилеглі до них тканини від вільних радикалів, які активно утворюються під час посиленого дихання. Здатність катехінів і танінів до окиснення призводить до утворення сполук, які за своїми властивостями гальмують ростові процеси та ускладнюють регенерацію тканин. Локалізація катехінів, які досліджували за інтенсивністю гістохімічних реакцій, характеризувалась гетерогенністю їх розподілу в тканинах. Окиснені та конденсовані флаван-3-оли (катехіни) і флаван-3,4-діоли (лейкоантоціанідини) є токсичними продуктами захисних реакцій, котрі в цілому негативно впливають на процеси росту та розвитку рослин в культурі *in vitro*. Оптимізація складу ЖС, що створює передумови для зниження інтенсивності синтезу і конденсації фенолів у тканинах первинних експлантатів, — складний, але вкрай важливий етап отримання асептичних органів, здатних до регенерації.

За результатами анатомічних досліджень встановлено, що синтез фенольних сполук найактивніше відбувається у живих тканинах первинної кори і серцевинних променів. Інтенсивність виділень фенольних сполук у стеблі має просторову тканинну неоднорідність і топологічно пов'язана з розташуванням вегетативних бруньок. З'ясовано, що найактивнішими у цьому відношенні є зони первинної кори, які розташовані безпосередньо під брунькою. Втім навіть такі ділянки кори виявляють активність паренхімних клітин. На поперечному зрізі стебла інтенсивно забарвлювалися

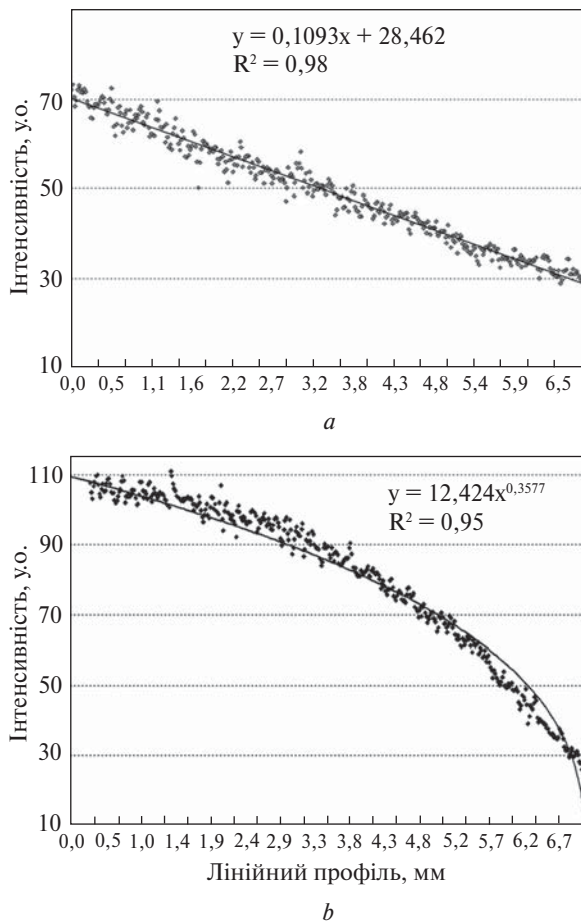


Рис. 2. Просторовий розподіл та окиснення виділень вторинних метаболітів експлантатів троянди ефіроолійної у живильні середовища *in vitro*: а — сорт Лань; б — сорт Лада

Fig. 2. Spatial distribution and oxidation of secondary metabolites exertions of *Rosa damascena* Mill. explants in *in vitro* culture media: a — Lan variety; b — Lada variety

також клітини серцевинних променів, проте лише в зоні вторинної кори. Таким чином, найактивнішими центрами синтезу фенолів у експлантатів на твердих ЖС є паренхімні клітини первинної і вторинної кори. Після обробки зрізів стебла реактивом Фоліна—Чокольтеу з наступною обробкою препарату розчином карбонату натрію місця накопичення фенольних сполук темнішали, що дало змогу виявити високий вміст фенолів у молодих клітинах ксилеми і флоєми, які межують з камбієм (рис. 3, с—е).

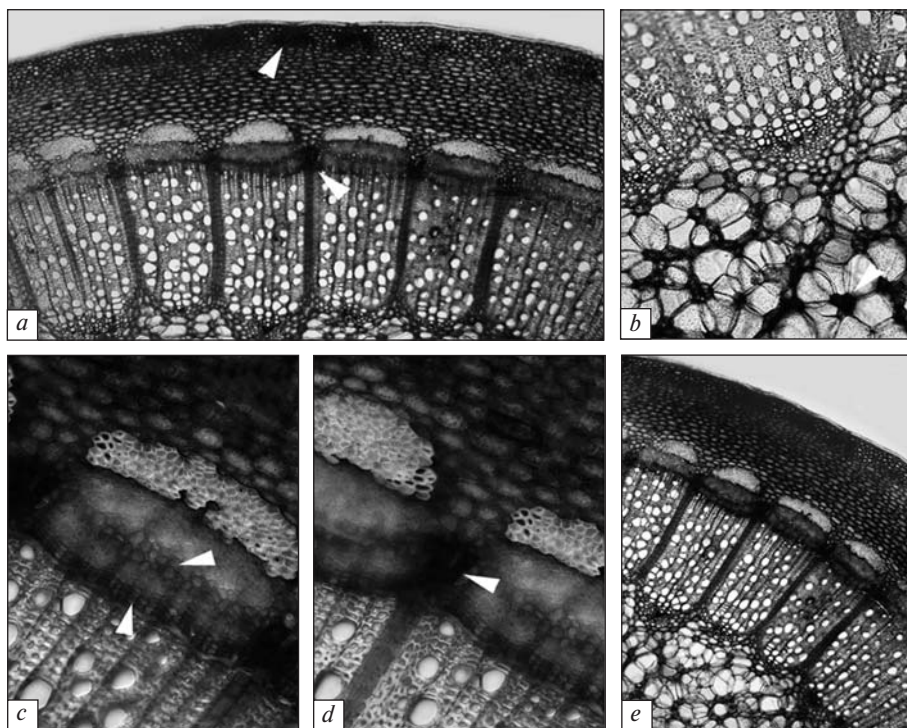


Рис. 3. Анатомічна будова і центри активного виділення фенольних сполук у пагонах троянди ефіроолійної сорту Лада в умовах *in vitro*: *a* — просторова гетерогенність тканин стебла за інтенсивністю виділення фенольних сполук (стрілками вказано темне забарвлення тканин); *b* — фрагмент перимедулярної зони стебла (накопичення фенольних сполук в окремих клітинах серцевинної паренхіми); *c* — фрагмент поперечного зрізу стебла в камбіальній зоні та флоемі (стрілками вказано тканини, які активно виділяють феноли); *d* — виділення фенольних сполук у серцевинному промені; *e* — гістохімічне виявлення тканин, які активно виділяють фенольні сполуки (реактив Фоліна—Чокольтеу)

Fig. 3. Anatomical structure and centers of active exertions of phenolic compounds in the stems of Lada variety of *Rosa damascena* Mill. in *in vitro* conditions: *a* — heterogeneity of stem tissue by intensity of exertion of phenolic compounds (dark color tissues indicated by arrows); *b* — fragment of perimedullary zone of the stem (accumulation of phenolic compounds in some cells of medullary parenchyma); *c* — a cross-section fragment of the stem in the phloem and cambial zone (tissues that actively produce phenols indicated by arrows); *d* — the exertion of phenolic compounds in medullary rays; *e* — histochemical detection of tissues that actively produce phenolic compounds (Folin—Ciocalteu phenol reagent)

Незначне накопичення фенольних сполук виявлено у дрібних клітинах і міжклітинниках серцевинної паренхіми. Частина з цих сполук належать до полімеризованих — флобафенів, стійких до розкладання органічними розчинниками.

Результати гістохімічної оцінки накопичення фенолів (за інтенсивністю % від максимальної) у флоемі та вторинній корі пагонів, використаних як експлантати, наведено на рис. 4. Установлено найбільшу концентрацію фенольних сполук у серцевинних променях стебла і молодій ксилемі, яка майже у 15—

18 разів перевищує їх вміст у волокнах склеренхіми та флоєми. З огляду на те, що серцевинні промені виконують транспортну і запасну функції, їх клітини можуть брати участь не лише у синтезі, а і в радіальному та вертикальному транспорті речовин.

Очевидно, що в процесах транслокації фенольних речовин і створенні передумов для ініціації росту пазушних бруньок серцевинні промені відіграють провідну роль. Функціональна активність клітин серцевинних променів залежить від вмісту осмолетиків, моно- і

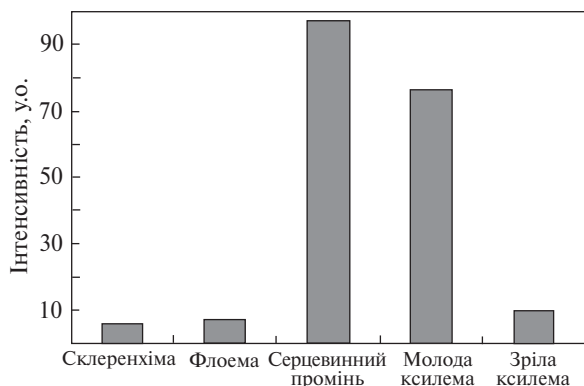


Рис. 4. Накопичення фенольних сполук (за інтенсивністю гістохімічної реакції, % від максимуму) у тканинах стебла троянди ефіроолійної сорту Лада

Fig. 4. The accumulation of phenolic compounds (intensity of histochemical reactions, %) in tissues of stem of Lada variety of *Rosa damascena* Mill.

дицукрів, кількості антиоксидантів нефенольної природи (аскорбінової кислоти, глутатіону), котрі здатні стримувати руйнівну дію вільних радикалів, кількість яких зростає зі збільшенням інтенсивності дихання клітин.

Незважаючи на те, що представлена модель є значним спрощенням реальної системи, вона має біологічний зміст і описує функціональний стан первинних експлантатів у недостатньо оптимізованому штучному середовищі.

Інтенсивний синтез вторинних метаболітів, який супроводжує травматичний стрес і забезпечує захист ушкоджених поверхонь від потенційно небезпечних патогенів, за умов їх надмірного накопичення гальмує регенерацію тканин і створює передумови для незворотних деструктивних процесів та передчасної загибелі клітин, які призводять до втрати цінного рослинного матеріалу.

Висновки

За результатами гістохімічних досліджень встановлено, що синтез фенольних сполук найактивніше відбувається у живих тканинах первинної кори і серцевинних променів первинних експлантатів сорту Лада, менш активно — сорту Лань. Інтенсивність виділень фенольних сполук на зрізах пагонів має про-

сторову тканинну неоднорідність, яка топологічно пов'язана з розташуванням вегетативних бруньок. З'ясовано, що активними центрами синтезу фенолів, зокрема катехінів, є тканини первинної кори, які розташовані безпосередньо під брунькою. У серцевинних променях вміст фенолів майже у 15–18 разів вищий за такий у клітинах склеренхіми та флоєми.

1. *Алехно Г.Д.* Клональное микроразмножение роз / Г.Д. Алехно, В.А. Высоцкий // Физиология и биохимия культурных растений. — 1986. — № 18. — С. 489—493.
2. *Андреева В.А.* Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
3. *Дженсен У.* Ботаническая гистохимия / У. Дженсен. — М.: Мир, 1965. — 377 с.
4. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функция в растениях / М.Н. Запрометов. — М.: Наука, 1993. — 272 с.
5. *Калинин Ф.Л.* Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнер, В.В. Сарнацкая. — К.: Наук. думка, 1992. — 232 с.
6. *Пилунская О.А.* Введение в культуру *in vitro* розы эфиромасличной / О.А. Пилунская // Науч. тр. Крым. гос. аграр. ун-та. — 1999. — № 58. — С. 88—97.
7. *Починок Х.Н.* Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починков. — К.: Наук. думка, 1976. — 336 с.
8. *Рубцова О.Л.* Рід *Rosa* L. в Україні: генофонд, історія, напрями досліджень, досягнення та перспективи / О.Л. Рубцова. — К.: Фенікс, 2009. — 375 с.
9. *Рубцова О.Л.* Селекція троянд: історія, досягнення, сучасна стратегія / О.Л. Рубцова, В.І. Чижанькова // Інтродукція рослин. — 2015. — № 1. — С. 69—75.
10. *Рубцова О.Л.* Підсумки інтродукції та селекції троянд у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України / О.Л. Рубцова, В.І. Чижанькова // Інтродукція рослин. — 2016. — № 2. — С. 12—17.
11. *Функции и свойства антоцианов растительного сырья* / А.М. Макаревич, А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович, Е.В. Решетников // Тр. БГУ. — 2010. — № 2. — С. 1—11.
12. *Charles S.B.* Flavonoids: new roles for old molecules / S.B. Charles, N. Imin, M.A. Djordjevic // Journal of Integrative Plant Biology. — 2010. — N 52. — P. 98—111.
13. *Charles S.B.* The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of arabidopsis roots to gravity and light / S.B. Charles, G.K. Muday // The Plant Cell. — 2004. — N 16. — P. 1191—1205.

14. Ray F.E. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development / F. Evert Ray. — New Jersey: Hoboken, 2006. — P. 473—501.

Рекомендувала до друку О.Л. Рубцова
Надійшла до редакції 02.11.2016

REFERENCES

1. Alekhno, H.D. and Vysotskyi, V.A. (1989), Klonalnoe mykrorazmnozhenyie roz [Clonal micropropagation roses]. Physiology and biochemistry of cultivated plants, N 18, pp. 489—493
2. Andreeva, V. A. (1988), Ferment peroksydaza: uchastye v zashchytnom mekhanizme rastenyi [The enzyme peroxidase: participation in the defense mechanism of plants]. M.: Science, 128 p.
3. Dzhensen, U. (1965), Botanycheskaia hystokhymyia [Botanical histochemistry]. M.: World, 377p.
4. Zaprometov, M.N. (1993), Fenolnye soedyneniya. Rasprostraneniye, metabolizm y funktsiya v rastenyakh [Phenolic compounds. Distribution, metabolism and function in plants]. M.: Science, 272 p.
5. Kalynyn, F.L., Kushnyr, H.P. and Sarnatskaia, V.V. (1992), Tekhnolohyia mykroklonalnoho rozmnozhenyia rastenyi [Technology microclonal plant propagation]. K.: Scientific thought, 232 p.
6. Pylunskaya, O.A. (1999), Vvedeniye v kulturu in vitro rozy efyromaslychnoi [Introduction to culture in vitro aromatic rose]. Proceedings of the Crimean State Agricultural University, pp. 88—97.
7. Pochynok, Kh.N. (1976), Metody byokhymycheskoho analiza rastenyi [Methods of biochemical analysis of plants]. K.: Scientific thought, 336 p.
8. Rubtsova, O.L. (2009), Rid *Rosa* L. v Ukraini: henofond, istoriia, napriamy doslidzhen, dosiahnenniia ta perspektyvy [The genus *Rosa* L. in Ukraine: gene pool, history, research areas, developments and prospects]. K.: Phoenix, 375 p.
9. Rubtsova, O.L. and Chyzhankova, V.I. (2015), Selekt-siia troiand: istoriia, dosiahnenniia, suchasna stratehiia [Rose Selection: history, achievements, modern strategy]. Introduction plants, N 1, pp. 69—75.
10. Rubtsova, O.L. and Chyzhankova, V.I. (2016), Pidsumky introduktsii ta selektsii troiand u Natsionalnomu botanichnomu sadu im. M.M. Hryshka NAN Ukrainy [Results of introduction and breeding roses in M.M. Gryshko National Botanical Garden of the NAS of Ukraine]. Introduction plants, N 2, pp. 12—17.
11. Makarevych, A.M., Shutova, A.H., Spyrydovych, E.V. and Reshetnykov E.V. (2010), Funktsyy y svoystva antotsyanov rastytelnoho syria [The functions and properties of anthocyanins vegetable raw materials]. Trudy BHU, N2, pp. 1—11.

12. Charles, S.B., Imin, N. and Djordjevic, M.A. (2010), Flavonoids: new roles for old molecules. Journal of Integrative Plant Biology, N 52, pp. 98—111.
13. Charles, S.B. and Muday, G.K. (2004), The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of arabidopsis roots to gravity and light. The Plant Cell, N 16, pp. 1191—1205.
14. Ray, F.E. (2006), Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. New Jersey: Hoboken, pp. 473—501.

Recommended by O.L. Rubtsova
Received 02.11.2016

О.А. Олейник¹, А.А. Кловаденко¹, А.Ф. Лиханов¹,
М.Д. Мельничук¹, В.И. Чижанькова²

¹ Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины,
Украина, г. Киев

² Национальный ботанический сад имени
Н.Н. Гришко НАН Украины,
Украина, г. Киев

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКСПЛАНТАХ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Исследован характер диффузии вторичных метаболитов розы эфиромасличной в питательную среду. Проведен гистохимический анализ побегов интактных растений и первичных эксплантатов на содержание катехинов и конденсированных танинов. Установлено, что синтез фенольных соединений наиболее активно происходит в живых тканях первичной коры и сердцевинных лучах однолетних побегов, где их концентрация в 15—18 раз превышает таковую в клетках склеренхимы и флоэмы. Наиболее активно фенольные соединения выделялись первичными эксплантатами сорта Лада, менее активно — сорта Лань. Показано, что интенсивность выделений фенолов из стебля в питательную среду имеет пространственную тканевую неоднородность, топологически связанную с расположением вегетативных почек. Выяснено, что наиболее активными в этом отношении являются зоны первичной коры, расположенные непосредственно под почкой. Установлено, что интенсивность выделения вторичных метаболитов зависит от сорта розы эфиромасличной, радиального размера эксплантата и степени его одревеснения.

Ключевые слова: фенольные соединения, вторичные метаболиты, роза эфиромасличная, культура *in vitro*.

O.O. Oliyuk ¹, A.A. Kluvadenko ¹, A.F. Likhanov ¹,
M.D. Melnychuk ¹, V.I. Chyzhankova ²

¹ National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, Ukraine, Kyiv

² M.M. Gryshko National Botanical Garden,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, Kyiv

PECULIARITIES OF ACCUMULATION OF PHENOLIC
COMPOUNDS IN EXPLANTS OF *ROSA DAMASCENA*
MILL. IN *IN VITRO* CONDITIONS

The character of the diffusion of secondary metabolites of *Rosa damascena* Mill. into the culture medium was studied. The histochemical analysis of intact plants shoots and primary explants on contents of catechins and condensed tannins was carried out. According to the results, it was found that the synthesis of phenolic compounds actively

occurs in the living tissues of the primary cortex and the medullary rays of annual shoots, where their concentration is 15–18 times higher than in the cells of sclerenchyma and phloem. The phenolic compounds were segregated actively — by primary explants of Lada variety, less actively by explants of Lan variety. It was shown that the intensity of the excretions of phenols from the stem into the culture medium had a spatial inhomogeneity of the tissue that is topologically related to the arrangement of vegetative buds. It was found that the most active in this regard were the primary cortical zones directly located below buds. It was determined that the intensity of secondary metabolites excretions depended on the type of *Rosa damascena*, the radial dimension and the degree of explants woodiness.

Key words: phenolic compounds, secondary metabolites, *Rosa damascena* Mill., *in vitro* culture.