

МОНОГРАФІЯ

## **ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ ТА ЇХ РОЛЬ В СИСТЕМАХ АДАПТАЦІЇ І ЗАХИСТУ РОСЛИН**

У монографії викладено дослідження, які розкривають теоретичні та практичні питання особливостей стійкості та захисту рослин до дії різноманітних чинників як біологічного походження, так і різних факторів навколишнього оточуючого середовища. Особливу роль відведено дослідженню ролі вторинних метаболітів особливо при вірусних інфекціях у рослин.

Монографію призначено для науковців, викладачів, аспірантів, студентів, керівників і спеціалістів аграрних формувань і всіх, хто цікавиться фундаментальними дослідженнями стійкості рослин й фітотерапії та проблематикою ведення ефективного рослинництва та сучасних агробіотехнологій.



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Мельничук М.Д., Ліханов А.Ф.,  
Коваленко Т.М., Клюваденко А.А.

# **ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ ТА ЇХ РОЛЬ В СИСТЕМАХ АДАПТАЦІЇ І ЗАХИСТУ РОСЛИН**

МОНОГРАФІЯ



Вінниця – 2022



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Мельничук Максим Дмитрович  
Ліханов Артур Федорович  
Коваленко Тетяна Мефодіївна  
Клюваденко Андрій Андрійович

**ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ ТА ЇХ РОЛЬ У СИСТЕМАХ  
АДАПТАЦІ І ЗАХИСТУ РОСЛИН**

**МОНОГРАФІЯ**

Вінниця – 2022

*Рекомендовано вченою радою Вінницького національного аграрного  
університету (Протокол № 3 від 31.10.2022 року)*

**Автори:**

**Мельничук Максим Дмитрович**, доктор біологічних наук, професор кафедри ботаніки, генетики та захисту рослин Вінницького національного аграрного університету, академік НААН України;

**Ліханов Артур Федорович**, доктор біологічних наук, професор кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції Національного університету біоресурсів і природокористування України;

**Коваленко Тетяна Мефодіївна**, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри ботаніки, генетики та захисту рослин Вінницького національного аграрного університету;

**Клюваденко Андрій Андрійович**, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії Національний університет біоресурсів і природокористування України

**Рецензенти:** Заїменко Н.В. - доктор біологічних наук, член-кореспондент Національної академії наук України, професор, директорка Національного ботанічного саду імені Миколи Гришка НАН України;

Драгатов І.В. - доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України;

Вдовенко С.А. – доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри лісового, садово–паркового господарства, садівництва та виноградарства Вінницького національного аграрного університету.

**ISBN 976-776-8811-60-0**

**Мельничук М.Д., Ліханов А.Ф., Коваленко Т.М., Клюваденко А.А.**

Вторинні метаболіти та їх роль у системах адаптації і захисту рослин. Монографія. Вінниця: ВНАУ. Видавець ТОВ «Друк» 2022. 192 с. (ум. – 10 друк. арк.)

У монографії викладено дослідження, які розкривають теоретичні та практичні питання особливостей стійкості та захисту рослин до дії різноманітних чинників як біологічного походження, так і різних факторів навколишнього середовища. Особливу роль відведено дослідженню ролі вторинних метаболітів особливо при вірусних інфекціях у рослин.

Монографію призначено для науковців, викладачів, аспірантів, студентів спеціальності 202 Захист і карантин рослин, керівників і спеціалістів аграрних формувань і всіх, хто цікавиться фундаментальними дослідженнями стійкості рослин і фітомедицини та проблематикою ведення ефективного рослинництва та сучасних агробіотехнологій.

УДК 632.938.1  
© ВНАУ, 2022

## ЗМІСТ

Передмова	5
<b>Розділ 1. МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ВПЛИВУ НЕСПРИЯТЛИВИХ ФАКТОРІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА</b>	6
1.1. Основні поняття стійкості рослин до стресорів	6
1.2. Особливості стійкості рослин до біологічних стресорів	9
1.3. Особливості методики визначення стійкості рослин	23
Список літератури до розділу 1	31
<b>Розділ 2. СПЕЦІАЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ, ПРОСТОРОВА ОРГАНІЗАЦІЯ І ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІСТЬ СЕКРЕТОРНИХ СИСТЕМ РОСЛИН</b>	33
2.1. Спеціалізовані секреторні клітини у листках гіркокаштана звичаного, або кінського каштана звичайного ( <i>Aesculus hippocastanum</i> )	33
2.2. Формування, структурні особливості секреторних систем у пагонах рослин хмелю звичайного ( <i>Humulus lupulus</i> L.)	39
2.3. Структурно–анатомічні особливості і секреторні системи пагонів вербозілля лучного ( <i>Lysimachia nummularia</i> L.)	48
2.4. Фітохімічний склад та біологічна активність індивідуальних сполук вегетативних і генеративних органів рослин вербозілля лучного ( <i>Lysimachia nummularia</i> )	59
Список літератури до розділу 2	67
<b>Розділ 3. ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН У ПРОЦЕСІ ОЗДОРОВЛЕННЯ І МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i></b>	70
3.1. Анатомо–гістохімічні особливості вегетативних органів малини звичайної	71
3.2. Динаміка активності пероксидаз у тканинах вегетативних органів українських сортів малини на різних етапах морфогенезу в умовах <i>in vitro</i>	87
3.3. Оцінка успішності адаптації плодово–ягідних культур в умовах плантаційного вирощування за комплексом біохімічних показників	88
3.4. Дослідження комплексу пластидних пігментів у листках малини звичайної	99
3.5. Визначення вмісту антоціанів у плодах малини звичайної методом спектрофотометрії	103
3.6. Визначення полімерних продуктів деградації антоціанів у плодах малини звичайної	107
Список літератури до розділу 3	110
<b>Розділ 4. КОМПЛЕКСНИЙ ПІДХІД ДО ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (<i>HUMULUS LUPULUS</i> L.)</b>	112
4.1. Підбір рослин донорів хмелю за морфологічними ознаками для культури <i>in vitro</i>	113



4.2. Оздоровлення рослин хмелю <i>in vitro</i> через використання наноаквахелатних комплексів мікроелементів	118
4.3. Підбір оптимальних концентрацій і форм нанорозмірних частинок біогенних металів для інтенсифікації процесів мікроклонального розмноження хмелю	122
4.4. Фізіологічні маркери оксидазного стресу у рослин хмелю в культурі <i>in vitro</i>	139
4.5. Особливості синтезу вторинних метаболітів рослин–регенерантів хмелю в умовах <i>in vitro</i>	142
Список літератури до розділу 4	147
<b>Розділ 5. ФЕНОЛКАРБОНОВІ КИСЛОТИ ТА ЇХ РОЛЬ У ПРОЦЕСІ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН ЗА УМОВ <i>IN VITRO</i></b>	149
5.1. Особливості впливу оксикоричних і оксибензойних кислот на вміст пластидних пігментів та фенольних сполук за умов вирощування рослин <i>in vitro</i>	150
5.2. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на морфогенез і фенольний синтез деревних рослин <i>in vitro</i>	157
Список літератури до розділу 5	161
<b>Розділ 6. ФЕНОЛЬНІ ІНГІБІТОРИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ ДЕРЕВИНИ</b>	162
Список літератури до розділу 6	165
<b>Розділ 7. ЗАЛЕЖНІСТЬ РОЗПОДІЛУ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ТКАНИНАХ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ</b>	166
Список літератури до розділу 7	173
<b>Розділ 8. ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕДАЧІ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НАСІННЯМ</b>	174
Список літератури до розділу 8	185

## ПЕРЕДМОВА

Дослідження і пізнання механізмів стійкості рослин до патогенів різного походження і несприятливих умов навколишнього середовища в останні десятиліття увійшло до числа найбільш актуальних і фундаментальних проблем фізіології рослин, вірусології та біотехнології. Це зумовлено, зокрема, біологічними інвазіями, надмірними стресами, спричиненими глобальними кліматичними змінами та зростанням антропогенного тиску на біосферу. Здатність рослинного організму адаптуватися до змін умов місцезростання – одна із базових функцій, яка визначає ареали поширення видів і можливість їхньої інтродукції як в агроценозах, так і в природних біоценозах.

Через посилення впливу на рослини різноманітних чинників антропогенного (важкі метали, аерополотанти, органічні ксенобіотики, різні види випромінювання) та біотичного походження (комахи–шкідники, фітопатогени, фітогельмінти тощо) безпосередньо зростає актуальність і значимість досліджень стану рослинних організмів у стресових умовах. Відомо, що для адаптації рослин до таких умов, особливе значення мають власно синтезовані низькомолекулярні біохімічні продукти вторинного синтезу. Через складні регуляторні мережі такі вторинні метаболіти чітко пов'язані з факторами транскрипції, що підвищує надійність епігенетичного контролю рослинного організму в стресових умовах. Так, процеси росту і розвитку рослин регулюються гормональними стимулами, а розподіл і транспорт фітогормонів контролюється вторинними метаболітами, зокрема флавоноїдами та іншими фенольними сполуками. Такий широкий спектр і біологічна поліфункціональність вторинних метаболітів слугує предметом сучасних молекулярно-біологічних і екофізіологічних досліджень, що дозволяє формувати систему знань про функціонування рослинного організму на різних стадіях онтогенезу. Безпосередньо з урахуванням умов місцезростання можна визначати потенційну стійкість інтродуцентів проти несприятливих чинників, збудників хвороб, шкідників, прогнозувати масштаби поширення інвазійних видів та оцінити загальний стан рослин в умовах антропогенної трансформації лісових і паркових екосистем. Водночас видоспецифічність якісного складу вторинних метаболітів, динаміка синтезу і біохімічної трансформації речовин під впливом різноманітних внутрішніх та зовнішніх стимулів, поліфункціональність і надзвичайна фізіологічна активність ускладнюють вивчення їхньої ролі як на рівні організму, так і на екосистемному.

Багаторазово науковцями вказується на визначну роль та функціональність вторинних метаболітів рослин. Їх не можна вивчати і розглядати абстрактно, залишаючи поза увагою їхнє просторове розташування, локалізацію в певних компартментах клітин і тканин, а також безпосередню біотрансформацію метаболітів у процесі ферментації під час порушення цілісності мембран внаслідок травматичних стресорів. Усі ці процеси, враховуючи надзвичайне різноманіття вторинних метаболітів, робить цей напрям досліджень надзвичайно актуальним і практичним.

До монографії включені фундаментальні теоретичні та практичні напрацювання авторів протягом багаторічних власних досліджень, які формують і розширюють уявлення та розуміння механізмів адаптації і захисту рослин та їхньої природи взаємодії з іншими організмами.



## Розділ 1

# МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ВПЛИВУ НЕСПРИЯТЛИВИХ ФАКТОРІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

### 1.1. Основні поняття стійкості рослин до стрес-факторів

Рослини під час розвитку зазнають впливу різноманітних факторів навколишнього середовища, що постійно змінюються. До факторів навколишнього середовища відносять:

- ✓ хімічні (кислотність середовища, солі, важкі метали тощо);
- ✓ фізичні (вологість, температура, освітлення, радіація);
- ✓ механічні (пошкодження);
- ✓ біотичні (збудники інфекційних захворювань, комахи–шкідники);
- ✓ антропогенні фактори (техніка по догляду за посівами, добрива, гербіциди, фунгіциди, інсектициди) [3, 16, 24].

Вплив факторів навколишнього середовища може призводити до небезпечних наслідків. В той же час не всі фактори здатні викликати реакцію організму. Для нормального росту та розвитку рослин певні фактори навколишнього середовища є необхідними. Серед них забезпеченість рослин вологою, освітленість, поживними речовинами тощо. Їхня наявність забезпечує потреби рослин і є необхідною для функціонування, розвитку, росту і розмноження [16, 24]. Зміна рівнів факторів навколишнього середовища, коли вони перевищують поріг чутливості, тобто виходять за межі фонових, можна назвати стресовими. Під дією стрес-факторів рослин можуть переходити від нормального фізіологічно стану до стану «стресу». Стан стресу – це загальна неспецифічна реакція організму на будь-які чинники зовнішнього середовища. Фактори, які спричиняють у рослин стан стресу умовно можна назвати стресорами. Під стресом організму рослин розуміють комплексні зміни у клітині або організмі, які забезпечують підтримку стійкості останнього тоді, коли зовнішні фактори такі, що нормальні фізіологічні особливості вже недостатні для підтримання життєдіяльності, а нові пристосування генотипу ще не завершилися через уповільнену реалізацію пристосувань [18, 22]. Стресовим вважається стан системи в період переходу у новий стан – стаціонарний. Реакції стресу організму призводять до змін генетичної інформації в організмі рослин. Ці зміни забезпечують довготривале або відносно довготривале пристосування.

У стані стресу умовно виділяють три фази: 1) Фаза відповіді організму – реакція тривоги, стривоження (початок стресу). Реакція стривоження проявляється у відхиленнях від фізіологічної норми та зниженні життєздатності організму. 2) Фаза пристосування-адаптації, відновлення. Фаза пристосування-адаптації включає процеси адаптації, репарації та ефекти досягнення підвищення стійкості. 3) Фаза виснаження. Вона настає за умови, що інтенсивність впливу стресу надто висока та перевищує можливості рослин до адаптаційні. Закінчується фаза виснаження хронічною хворобою або загибеллю

організму. 4) Фаза відновлення або регенерації. Це часткове або повне відновлення фізіологічної функції організму після припинення дії стрес-фактору та коли пошкодження рослин було не надто сильним [5, 20]. Виділення явища, які спричиняють стрес у рослин є складним процесом, так як за дії факторів стресу в організмі відбуваються, пошкодження, які проявляються на різних рівнях функціональної і структурної організації рослини. При стресі у рослинних організмів може відбуватись порушення напівпроникності мембран, денатурація білків, в клітинах можуть накопичуватись токсичні метаболіти тощо. Також за дією стрес-факторів можуть виникати реакції-відповіді, які сприяють пристосування рослин до нових умов. Реакції-відповіді супроводжуються у рослин змінами в фізіологічних функціях, метаболізмі, експресії генів. Процеси, які пов'язані з пошкодженнями і пристосуванням організму, можуть відбуватися одночасно, але на різних стадіях реакції на стрес співвідношення між ними може змінюватися [9].

У процесі адаптації рослина набуває стійкості до дії стресора. Адаптація – це стан біологічного об'єкта, який характеризується підвищеною стійкістю при повторній дії стресора, який призвів до відповідних пристосувальних реакцій. Адаптація здійснюється за рахунок можливостей організму закладених в генотипі, тобто в спадково обумовлених межах можливих змін у реалізації генотипу. Адаптаційними змінами є загартування рослин до низьких та високих температур [11, 27, 30]. Адаптація спадково закріплена ознака, присутня в рослинному організмі незалежно від того, перебуває рослина в стресових умовах або ні. Адаптаційні зміни сприяють пристосуванню популяції організмів до певних умов навколишнього середовища. При спадковому закріпленні адаптаційних ознак явище називається генетичною адаптацією організму. Під час переходу від стресового стану до пристосувальних, адаптаційних реакцій, відбуваються зміни, які виявляються у інгібуванні активних генів (експресії генів), які за нормальних умов контролюють фізіологічні властивості організму, ріст, розвиток, фотосинтез та інші. Коли відбувається перехід від стресового стану організму до адаптації, активується система генів, яка забезпечує пристосування організмів до існування за несприятливих умов. Відбуваються зміни у будові генів стресових білків і генів, які контролюють синтез специфічних адаптогенів [12, 13, 29]. Відбуваються фізіолого-біохімічні зміни, перебудова структури або морфологічні проявами пристосування. Морфологічні прояви пристосування проявляються на рівні клітини або тканини, змінюється форма або розміри клітин, спеціалізація тканин, їхня структура, можуть відбуватись зміни на рівні цілісного організму – зміна форми, розмірів, співвідношення органів тощо. Завдяки адаптаційним пристосуванням в організмі формується стійкість до несприятливих стрес-факторів [21, 31].

Стійкість – ознака, яка генетично успадковується у поколіннях. Разом з тим стійкість рослин змінюється в процесі онтогенезу та під впливом зовнішніх факторів. Стійкість рослинних організмів до впливу несприятливих стрес-факторів є потенційною властивістю, яка може бути реалізована



повною мірою в екстремальних умовах. Спостерігаючи за характером рослин під час реакції-відповіді організму на дію несприятливих факторів навколишнього середовища, можна отримати необхідну інформацію про стійкість організму до певного стрес-фактору. Стійкість рослин до абіотичних стресорів (посуха, засолення середовища, стресові температури) визначається за допомогою функціонування індукованих та конститутивних захисних систем організму. Ці захисні системи організму закріплюються генетично. Конститутивні системи захисту постійно знаходяться у функціонально активному стані, а індуковані системи захисту в нормальному стані організму відсутні, виявляються ж лише у відповідь на дію стресового чинника. Конститутивні механізми стійкості у рослин до тих чи інших чинників середовища – результат генетичної адаптації протягом еволюції. При формуванні конститутивних механізмів стійкості використовуються усі можливі стратегії пристосування організму, в тому числі і мутації. Індуковані механізми стійкості рослин формуються протягом життя індивідуального організму в результаті пристосування до впливу факторів навколишнього середовища. Індуковані механізми стійкості формується в організму під час попередньої дії на нього того самого фактору, тому є результатом загартування. Рослини у яких спостерігається конститутивна стійкість пошкоджуються при вищій інтенсивності дії стрес-фактору порівняно з реакцією нестійких рослин, які пристосовуються до стрес-фактору в більшості за рахунок індукованих механізмів стійкості. Стійкість рослин є відносною характеристикою видів і сортів. Їхня стійкість до стрес-факторів забезпечується індивідуальними особливостями метаболізму. Функції метаболізму полягають не лише в сукупності процесів обміну речовин та енергією, а також у сприйнятті, збереженні, переробці і використанні отриманої інформації. В процесі життєдіяльності у клітин організму з'явилися пристосування, які дозволяють сприймати, перетворювати та посилювати отримані зовні сигнали фізичної і хімічної природи та за допомогою генетичного апарату здійснювати реакцію на стрес-фактори. У результаті перепрограмування геному під дією стрес-фактору відбуваються метаболічні зміни, які призводять до морфологічних і фізіологічних пристосувань. Під стійкістю розуміють здатність організмів зберігати свою життєздатність в умовах, які змінюються. Рівень стійкості певного організму не є сталим. Він може підвищуватися при загартуванні та знижуватися при первинній реакції на стрес-фактор. Під час онтогенезу стійкість організму неоднакова. Рівень стійкості низький у період проростання насіння і підвищується при формуванні вегетативних органів та зменшується при формуванні генеративних органів [1, 22, 32]. Максимальний рівень стійкості спостерігається під час анабіозу (тимчасовий стан організму, під час якого усі життєві процеси в організмі уповільнюються і майже зникають ознаки життя). У деяких організмів тимчасове пригнічення або майже повне припинення життєдіяльності увійшло до циклу розвитку, зокрема насіння, спори, цисти.

Рівень стійкості організму прямопропорційно залежить від характеру впливу стрес-фактору (раптова дія, пролонгована або хронічна) та умов за яких здійснюються спостереження за станом організму після припинення дії стрес-фактору. Первинна стійкість організму визначається коли здійснюється короточасний інтенсивний вплив стрес-фактору (наприклад, підвищення температур) з встановленням ефекту несприятливого чинника одразу після його впливу. При цьому не враховуються механізми відновлення порушених функцій та структур. У разі визначення стійкості рослин при проведенні тривалих експериментів або при визначенні стійкості за виживанням організмів чи інтенсивністю росту рослин через певний період часу після впливу стрес-фактору встановлюється загальна стійкість. Загальна стійкість включає поєднання механізмів, які забезпечують первинну стійкість організму і ліквідацію отриманих пошкоджень.

## **1.2. Особливості стійкості рослин до біологічних стресорів**

До основних біологічних стрес-факторів для рослинних організмів належать фітофаги та збудники захворювань. На різних етапах онтогенезу рослини зазнають впливу патогенних організмів (бактерій, вірусів, паразитичних грибів, комах-шкідників, кліщів, нематод та інших). У рослин є великий арсенал пристосувань для захисту від впливу можливих збудників захворювань та шкідників. Бар'єром для деяких збудників захворювань (вірусів, бактерій і грибів) є кутикула та перидерма, які обмежують надходження патогенних організмів до рослинного організму, але основним методом захисту є біохімічна система рослин [5, 23, 28].

Найважливішою ознакою живих організмів є постійний обмін речовин і енергії, при яких у живій клітині одночасно відбувається величезна кількість процесів, які прямо або опосередковано пов'язують організм і навколишнє середовище. Обмін речовин або метаболізм – це сукупність процесів, які відбуваються у клітині в певній послідовності, забезпечуючи відтворення біомаси. Швидкість проходження цих процесів і їх спрямованість мають бути чітко скоординовані в часі та просторі для забезпечення необхідного для обміну речовин поєднання пластичності і стійкості рослин. Направленість у складній системі реакцій рослин неможлива без відповідних механізмів регуляції та управління, які забезпечують стан гомеостаз. Основними механізмами у регуляції обмінних процесів рослинних організмів є сукупність хімічних реакцій, результатом яких є утворення первинних та вторинних метаболітів. Первинні метаболіти утворюються в процесі асиміляції речовин, які надходять до живого організму ззовні, в органічні речовини самого організму. Вони властиві всім живим організмам (синтез нуклеїнових кислот, білків, вуглеводів, амінокарбонових кислот, вітамінів, ліпідів, ферментів, органічних кислот та пуринів). Білки, ліпіди і вуглеводи становлять структуру клітин і тканин рослинного організму, вони беруть участь у процесах біосинтезу, є ефективним енергетичним матеріалом. Білки



та амінокислоти лікарських рослин використовуються в медицині. При застосуванні препаратів на їхній основі отримують неспецифічну сприятливу дію на організм хворого. Зокрема, такі препарати впливають на синтез білків, створюють умови для посиленого синтезу імунних тіл, що призводить до підвищення захисних сил організму. Покращення синтезу білків в організмі відповідно включає також і посилений синтез ферментів, внаслідок чого поліпшується обмін речовин в організмі. Препарати на основі амінів та амінокислот відіграють важливу роль в нормалізації нервових процесів.

Білки це біополімери, структурну основу яких складають довгі поліпептидні ланцюги, побудовані із залишків  $\alpha$ -амінокислот, з'єднаних між собою пептидними зв'язками. Білки поділяються на прості, які при їх гідролізі дають тільки амінокислоти, та складні, в яких білок пов'язаний з речовинами небілкової природи, зокрема, з нуклеїновими кислотами (нуклеопротеїни), полісахаридами (глікопротеїди), ліпідами (ліпопротеїди), пігментами (хромопротеїди), іонами металів (металопротеїни), залишками фосфорної кислоти (фосфопротеїди). Ліпіди – це жири та жироподібні речовини, які є похідними вищих жирних кислот, спиртів або альдегідів. Вони поділяються на прості і складні. До простих відносяться ліпіди, молекули яких містять тільки залишки жирних кислот (або альдегідів) і спиртів. До складу **простих ліпідів рослинних організмів** олій і жирів входять гліколіпіди. Складні ліпіди поділяються на дві великі групи: 1) фосфоліпіди; 2) гліколіпіди, до яких відносять сполуки, які мають у своїй структурі вуглеводний компонент або залишок кислоти фосфорної. Ліпіди у складі живих клітин рослин і тварин відіграють важливу роль в процесах життєзабезпечення, утворюючи енергетичні резерви.

Нуклеїнові кислоти – це продукти первинного метаболізму рослинних організмів, біополімери, мономерними ланками яких є нуклеотиди, що складаються з залишку фосфорної кислоти, вуглеводного компонента (араб чи дезоксирибози) і азотистого (пуринового або піримідинового) залишку. Розрізняють дезоксирибонуклеїнові (ДНК) і рибонуклеїнові (РНК) кислоти. Нуклеїнові кислоти рослинних організмів в лікувальних цілях поки не використовуються.

Особливе місце серед білків займають ферменти рослин. У рослинних організмах роль ферментів специфічна, оскільки вони каталізують та направляють більшості хімічних реакцій, які відбуваються в організмі. Всі ферменти поділяють на дві групи: однокомпонентні та двокомпонентні. Однокомпонентні ферменти містять лише білки, двокомпонентні – білок (апофермент) та небілкову активну простетичну частину (кофермент). Коферментами можуть бути вітаміни.

Поряд з вуглеводами та білками найпоширенішими речовинами в рослинах є органічні кислоти. Вони беруть участь в диханні рослинних організмів, біосинтезі білків, жирів та інших речовин. Органічні кислоти відносяться як до речовин первинного синтезу (яблучна, оцтова, щавлева,

аскорбінова кислоти), так і вторинного синтезу (урсолова, олеанолова кислоти). Вони є фармакологічно активними речовинами, зокрема урсолова та саліцилова кислоти мають протизапальну дію; бурштинова та яблучна кислоти відносяться до донорів енергетичних груп, сприяють підвищенню фізичної і розумової працездатності людей; аскорбінова кислота використовується в медицині, як джерело вітаміну С.

Великий клас органічних речовин вуглеводи. До них відносяться поліоксікарбонільні сполуки та їхні похідні. Залежно від кількості мономерів в молекулі вуглеводів вони поділяються на моносахариди, олігосахариди та полісахариди. Моно- і олігосахариди відносять до нормальних компонентів різних живих клітин. Коли такі вуглеводи накопичуються в значних кількостях, їх відносять до так званих ергастичних речовин. Полісахариди в більшості накопичуються в значних кількостях у вигляді продуктів життєдіяльності протопласта. У фармакології моносахариди та олігосахариди рослинного походження використовуються в чистому вигляді, зазвичай це глюкоза, фруктоза та сахароза. В рослинних організмах синтезуються різні форми полісахаридів. Полісахариди рослинних організмів відрізняються один від одного, як за структурою, так і за функціями, які вони виконують в організмі. Полісахариди в різних формах досить широко застосовуються в медицині. Зокрема, широкого застосування набуло використання крохмалю та продуктів його гідролізу, целюлози, пектину, альгінатів, камеді.

Вторинні метаболіти утворюються у певних видів живих організмів та не беруть участі у процесах розмноження та зростання. Вторинні метаболіти синтезуються переважно в малорухомих груп живих організмів – бактерій, грибів, рослин і губках, проте і ці метаболіти виконують певні функції [19, 29]. В організмі тварин вторинні метаболіти утворюються рідко, а потрапляють до організму разом з рослинною їжею.

Терміни «вторинний метаболізм» та «вторинні метаболіти» в біології почали застосовувати в кінці XIX століття за визначенням професора Альбрехта Косселя. В Берліні у 1891 році Коссел на зборах Фізіологічного суспільства прочитав лекцію «Про хімічний склад клітин», матеріал по якій було опубліковано того ж року в *Archiv fur Physiologie*. У ній Альбрехт Коссел вперше запропонував розділити складові клітини рослинного організму на первинні і вторинні речовини. За його визначенням: «Первинні метаболіти присутні в кожній рослинній клітці, яка здатна до поділу, проте речовини вторинного метаболізму присутні в клітинах тільки «ненавмисно» та не потрібні для життя рослинного організму. Випадкове поширення вторинних метаболітів в рослинному організмі, їх нерегулярне знаходження в близьких за видовим складом рослин, може свідчити про те, що синтез цих сполук пов'язаний з процесами, які не є невід'ємними для кожної клітини, а мають швидше вторинний характер ... Я пропоную називати сполуки, що мають важливість для кожної клітини первинними, а метаболіти, не присутні в будь-якій рослинній



клітині – вторинними». З даного визначення зрозуміло походження назви цих сполук «вторинні метаболіти» – тобто «випадкові», другорядні.

Утворюються вторинні метаболіти в рослинах під впливом різних ферментів тільки на основі білків, ліпідів і вуглеводів. Вторинний метаболізм розглядають як здатність живого організму взаємодіяти з генетичним матеріалом та власними ферментами. Вторинні метаболіти утворюються у результаті процесу дисиміляції – розпаду продуктів первинного синтезу. Зокрема глюкоза, яка відноситься до речовин первинного синтезу, розпадається з утворенням оцтової кислоти, з якої в процесі метаболізму синтезується мевалонова кислота та інші проміжні продукти, зокрема терпени. Під час процесу дисиміляції виділяється енергія, яка бере участь в утворенні вторинних метаболітів [19]. До речовин вторинного метаболізму відносяться, зокрема, терпени, глікозиди, фенольні сполуки, алкалоїди, які беруть участь в обміні речовин та виконують важливі функції для рослин.

При первинних дослідженнях вторинних сполук їх вважали непотрібними продуктами життєдіяльності живих організмів. Сьогодні ж встановлено, що вторинні метаболіти відіграють певну роль в обмінних процесах, зокрема:

1) фенольні сполуки беруть участь у процесах дихання, фотосинтезу, утворенні фітогормонів, розвитку кореневої системи, передачі електронів; мають антимікробну дію, приваблюють комах–запилювачів; зумовлюють забарвлення певних частин рослини;

2) дубильні сполуки забезпечують вироблення у рослин стійкості до впливу збудників грибних захворювань;

3) каротиноїди беруть активну участь у фотосинтезі, створюють захист організмів від фотоокислення;

4) алкалоїди (глікоалкалоїди, пуринові, беталаїни, пірідінові, протоалкалоїди, імідазолові та інші) забезпечують регуляцію росту;

5) ізопреноїди (терпени та їх похідні це стероїди та терпеноїди) забезпечують вироблення у рослин захисту до впливу бактерій, комах, тварин;

6) антраценпохідні (похідні антрона, алізарина, хризацина та інших сполук);

7) глікозиди (олігозиди, біозиди, монозиди, тіоглікозиди та ціаногені глікозиди);

8) стероли забезпечують регулювання проникності мембран клітин.

Вторинні метаболіти рослинних організмів мають унікальні властивості. Наприклад, алкалоїди кураре є сильною отрутою, а певні групи глікозидів мають яскраво виражену терапевтичну дію і використовуються для приготування медичних препаратів, які застосовуються для лікуванні серцевої недостатності людей. Фенольні сполуки синтезуються в усіх рослинах (має високу молекулярну масу натуральний каучук) [9, 19].

Класифікації вторинних метаболітів рослин поділяються залежно від властивостей їхніх сполук.

Емпірична або тривіальна класифікація – стародавній принцип класифікації вторинних метаболітів, основою якого є властивості речовин

вторинного походження (приміром алкалоїди мають лужні властивості; сапоніни при струшуванні утворюють піну; гіркоти характерні відповідним гірким смаком; ефірні масла - ароматні летючі вторинні метаболіти). Тривіальний принцип класифікації має багато недоліків, проте ця класифікація зустрічається ще й досі в силу традиції та тривалого використання. Вторинні метаболіти набувають свої назви емпірично. Найбільш часто назви вторинних сполук походять від рослини, з якої вперше їх було виділено (алкалоїд папаверин походить від мак, берберин – від барбарису, кокаїн – від кокаїнового куща). Часто назви вторинних сполук пов'язують з міфологією, історією тощо (алкалоїд морфін названо на честь давньогрецького бога сну). Тривіальний спосіб класифікації та встановлення назв вторинних сполук часто призводить до непорозумінь. Біологічно активні тритерпенові глікозиди женьшеню одночасно почали вивчати японські та російські вчені. Японські вчені запропонували називати тритерпенові глікозиди женьшеню гінзенозідами (за видовою назвою рослин женьшеню), тоді як їхні російські колеги – панаксозиди (за родовою назвою).

Хімічна класифікація ґрунтується на характеристиках хімічної структури вторинних сполук. Ця класифікація найбільш поширена, а її недоліком є те, що речовини однієї й тієї ж групи можуть відрізнятися за властивостями та способом утворення. Візьмемо, хоча б алкалоїди: за хімічною класифікацією це сполуки, які мають атом азоту в гетероциклі. І за цією ознакою глікоалкалоїд картоплі або томату типові алкалоїди, проте за способом їх синтезу, структурою та властивостями ці сполуки відносяться до ізопреноїдів.

Біохімічна класифікація має у своїй основі спосіб біосинтезу вторинних сполук. І така класифікація вторинних сполук є найбільш обґрунтованою. У відповідності до біохімічної класифікації глікоалкалоїди прирівнюються до тритерпенових псевдоалкалоїдів, оскільки їх синтез відбувається як і стероїдних глікозидів, ізопреноїдним шляхом. Враховуючи недостатню дослідженість біохімічних властивостей рослин застосування біохімічної класифікації обмежене.

Функціональна класифікація ґрунтується на певних функціях речовин в живому організмі. За нею в одній і тій же групі можуть знаходитись вторинні метаболіти, які мають різну хімічну структуру. Фітоалексини – це вторинні сполуки, які мають захисні функції та синтезуються в рослинному організмі у відповідь на атаку патогенного організму. Ці сполуки представлені різними видами фенольних сполук, ізопреноїдів, поліацетиленами та ін. Розробка цієї класифікації вторинних сполук тільки починається, але вже зараз вона має виняткове значення для дослідження фізіології рослин [19, 24].

Основна складність при класифікації вторинних метаболітів полягає в тому, що кожна їхня група тісно пов'язана з іншими (гіркоти – клас терпенів є глікозидами, каротиноїди – похідні тетратерпенів і так далі). При використанні різних ознак вторинних сполук рослин за різними класифікаціями може виникати «перекриття» груп метаболітів, оскільки фітохімічні речовини

можуть містити ряд ознак, які є характерними для різних груп вторинних метаболітів. Але у деяких випадках цю проблему можна вирішити, коректуючи хімічну класифікацію вторинних метаболітів біохімічною.

Сьогодні відомо більше кількох десятків груп вторинних сполук. Крім того, деякі групи можуть налічувати по декілька тисяч окремих сполук, а інші – включати лише одну. Фенольні сполуки та ізопреноїди містяться у всіх різновидностях рослин, тоді як деякі групи (ацетогеніни або тіофени) відмічені лише у одиничних видів.

Найкраще вивченими є три найбільші групи вторинних метаболітів – фенольні сполуки, ізопреноїди (терпеноїди) та алкалоїди. Кожна з цих груп включає кілька тисяч вторинних сполук та поділяється на різні підгрупи. Відомо близько десятка груп вторинних метаболітів, які є менш численними, зокрема небілкові амінокислоти, рослинні аміни, глюкозинолати, ціаногенні глікозиди, беталаїни, поліацетілені, тіофени, алкіламідні та ін. Кількість вторинних сполук, які входять до цих груп, коливається від одиниць і до кількох сотень [19].

Алкалоїди це азотомісткі органічні сполуки, переважно рослинного походження. Будова молекул алкалоїдів рослинних організмів є дуже різноманітною та складною. В молекулах алкалоїдів азот, як правило, включений до гетероциклів, проте іноді розташовується в бічному ланцюзі. Класифікують алкалоїди на основі будови гетероциклів, або згідно їх біогенетичних попередників, якими виступають амінокислоти. Алкалоїди володіють специфічними властивостями і широко використовуються в медицині. Зараз відомо більше 10 тисяч алкалоїдів, і всі вони мають велику фармакологічну активність. Концентрація алкалоїдів в рослинній сировині зазвичай не більше кількох відсотків, проте в корі хінного дерева вона досягає 15-20%. Алкалоїди концентруються в різних тканинах та органах. Відмічено, що вони часто накопичуються не в тих тканинах, де відбувається їх синтез. Зокрема, нікотин запасується в листі тютюну, а синтезується в коренях. Найбільш відомими алкалоїдами є папаверин, кодеїн, морфін, які вперше були виділені з коробочок снотворного маку (*Papaver somniferum*). Алкалоїди, які називають «сонний одуром», виділені з беладони (*Atropa belladonna*), входять до вмісту великої кількості медичних препаратів, таких як солутан, бесалол, беллатаминал, беллалгін. У сучасній онкології широкого поширення набули алкалоїди з барвінку (*Catharanthus roseus*) – вінкристин та вінбластин, а також виділені з коренів раувольфії (*Rauvolfia serpentina*) аймалин та резерпін, які використовуються для зниження тиску та як психотропні засоби. До основних груп алкалоїдів відносять піридінові, пірролідінові, пірролізидінові, піперидинові, хінолізидінові, хіназіліні, хінолінові, ізохінолінові, індольні, дігідроіндольні (беталаїни), імідазолінові, пуринові, стероїдні (глікоалкалоїди), дітерпенові і алкалоїди без гетероциклів (протоалкалоїди).

Ізопреноїди перевершують за кількістю виділених сполук всі інші класи вторинних метаболітів, оскільки їх виділено більше 23 тисяч. Є ізопреноїди унікальні за фізіологічними властивостями, зокрема, таксол, виділений з кори



тисового дерева. Ця речовина є надзвичайно активним цитостатиком і проявляє свою дію на ракові клітини в дуже малій кількості. Тож сьогодні на використання її сполук в онкології покладають великі надії. Фармакологічні властивості ізопреноїдів годі переоцінити, велика їх кількість відносяться до серцевих глікозидів та карденолідів. Зокрема, з двох видів наперстянки пурпурової (*Digitalis purpurea*) і наперстянки шерстистої (*Digitalis lanata*) виділено приблизно 50 карденолідів, а також дигитоксин. У медичній практиці широко застосовують природний глікозид к-строфантозид, який є необхідним засобом для надання невідкладної допомоги, оскільки діє на серце людини вже через 1-3 хв. після введення внутрішньовенно. Цей препарат виділяють з насіння ліани *Strophanthus kombe*, яка поширена в тропічних лісах Африки. А місцеве населення використовувало сік цієї ліани як отруту для стріл, з якими виходило на полювання. З конвалії травневої (*Cjnvallaria majalis*) виділяють серцеві глікозиди, які за своєю активністю перевершують інші серцеві глікозиди (наприклад, дигітоксин).

Важливими елементами вторинного синтезу є фенольні сполуки. Функції фенольних сполук різноманітні і до кінця не вивчені. Фенольні сполуки здатні забарвлювати генеративні та вегетативні органи, надавати запах та смак, а також мають здатність поглинати ультрафіолетове світло. До хімічних властивостей фенольних сполук перш за все відносять антиоксидантну та комплексоутворювальну. Використовуючи їх фенольні сполуки здатні нейтралізувати активні радикали, виводити з організму радіоактивні елементи та важкі метали, сприяти захисту рослин та інших живих організмів від дії несприятливих чинників.

Фенольні сполуки та флавоноїди беруть безпосередню участь у регуляції роботи фітогормонів, дубильні речовини підвищують стійкість рослин до посухи, а також забезпечують захист коренів на кислих ґрунтах. Вони також сприяють покращенню процесів живлення рослин та здатні виконувати особливу роль додаткових ресурсів при первинному метаболізмі. Флавоноїди найчисленніша і широко поширена в рослинах група фенольних сполук. Флавоноїди виділено з коренів солодки (*Glycyrrhiza glabra*), трави пустирника (*Leonurus cordiaca*), квітів безсмертника (*Helichryzum arenarium*). Вони володіють широким спектром фармакологічних властивостей, мають кардіотонічну, жовчогінну, бактерицидну, спазмолітичну дію, зменшують ламкість та покращують проникність судин (наприклад, рутин), мають здатність зв'язувати та виводити з організму радіонукліди, в них також виявлено протиракові властивості. Флавоноїд – лютеолін, виконує функцію медіатора рослин для проходження успішної колонізації коренів бобових рослин симбіотичними азотфіксуючими бактеріями [5, 16].

Фенольні сполуки відносяться до компонентів електротранспортних ланцюгів при фотосинтезі та диханні, беруть участь у окисно-відновних процесах, виконують роль регуляторів розвитку та росту рослин. Фенольні сполуки задіяні в процесах виникнення індукованої та конституційної

стійкості рослин до стрес-факторів, а також регуляції симбіотичних зв'язків рослин з мікроорганізмами. Флавоноли та флаволи відносять до жовтих пігментів рослинних організмів, які застосовувались у виробництві для фарбування тканин. Характерною особливістю флавонолів є їхня здатність утворювати поліметоксилировані та полігідроксилировані сполуки. Це, зокрема, сполуки кверцетагетину та дигицитрину. Флавоноли звичайно присутні у тканинах рослинних організмів у вигляді глікозидів. Важливою особливістю флавонолів є також здатність поглинати світло в більш короткохвильовій частині спектра (280-320 нм), аніж антоціани. З огляду на це однією з основних функцій флавонолів і флавонолів є захист рослинних тканин, зокрема епідермальних, від ультрафіолетових променів. Клітини епідермісу листків рослин, пропускають 70-80 % видимого світла, та здатні утримувати до 95 % ультрафіолетового випромінювання. Також, флавоноїди мають здатність функціонувати як сигнальні речовини при їх взаємодії з патогенними мікроорганізмами. Крім того, флавоноїди використовуються рослинами для захисту від травоядних та відіграють важливу роль у формуванні імунітету рослин, зокрема синтезі фітоалексинів.

Флавоноли витрачаються рослинними організмами під час реакцій відновлення антоціанів та катехінів. Останні – це флавоноїди, які відносяться до найвідновлюваніших. Катехіни здатні утворювати ефіри з галовою кислотою, яка відноситься до мономерів гідролізованих танінів. Вони дуже поширені у рослинних організмах, перебувають у вигляді кристалічних безбарвних сполук, можуть легко розчинятися у воді та органічних розчинниках – спирті, ацетоні, діоксані, етилацетаті. Катехіни синтезуються увисокою біологічною активністю і сприяють надходженню вітаміну Р в організм т плодах, корі і деревині різних видів деревних рослин. Також вони володіють варин та людини. При ураженні рослинних організмів збудниками захворювань збільшується вмісту катехінів на 8-21 %, порівняно з неураженими.

Антоціани відносяться до основних пігментів рослинних організмів, які виконують функцію атрактантів для запилення квітів, а також для розповсюдження плодів. Ці пігменти в рослинах забезпечують різноманітність забарвлення квітів, листків та плодів. Вони беруть безпосередню участь в окисно-відновних процесах, про що свідчить інтенсивне дихання в рослинах, які відносяться до антоціановмісних. Антоціани разом з аскорбіновою кислотою володіють антиоксидантними властивостями, а також виконують функції захисних пігментів, які за необхідності захищають клітини мезофілу від впливу ультрафіолетових сонячних променів. Присутність антоціанових сполук у рослинних організмах сприяє інтенсивному поглинанню сонячної енергії. За умов дії стрес-фактору, внаслідок підвищення вмісту антоціанів, у листків часто спостерігається яскраво червоне забарвлення. Антоціани відіграють важливу роль під час дії активного та пасивного імунітету рослин відносно збудників захворювань. Антоціани є непластидними пігментами. У клітинах рослинного

організму вони сконцентровані у вакуолях в формі солей з органічними кислотами. В рослинних тканинах вони наявні виключно в формі глікозидів.

Катехіни відносять до відновленої форми флавоноїдів, антоціани – до окисленої. Катехіни, антоціани та флавоноли розглядаються як екологічні маркери рослинних організмів, які беруть безпосередню участь в пристосувальних реакціях.

Процес синтезу фенольних сполук у рослинному організмі залежить від факторів довкілля та суттєво змінюється під дією стресорів внаслідок ліміту необхідних для існування ресурсів, які потрібні для забезпечення балансу між ростом рослин та синтезом вторинних метаболітів [9]. В метаболізмі рослинних організмів переважають процеси, які сприяють забезпеченню нормального росту та розвитку. Кількість фенольних сполук у листках берези бородавчастої або повислої (*Betula montana* V.N.Vassil.) збільшується у процесі її росту та розвитку. Відповідно, в період активного утворення листків у кроні дерев відбувається одночасне утворення вторинних метаболітів у необхідній для рослин кількості. Отже, при високій доступності вуглецю в період активного процесу фотосинтезу, в середині вегетації, це не спричиняє збільшення концентрації фенольних сполук.

Певні класи фенольних сполук (флавоноли та антоціанідини) часто синтезуються в дводольних, а сінапова та ферулова кислоти характерні для однодольних рослин. Виявлено відмінності в розміщенні фенольних сполук у різних органах рослин. Зокрема, антоціани знаходяться переважно у плодах та пелюстках, флавоноли та флаволи синтезуються в надземних органах рослин, а фенолкарбонові кислоти накопичуються в тканинах усіх органів.

Вторинні метаболіти відносяться до біологічно активних речовин і здатні впливати на проходження метаболізму в рослин, а також у формі фенольних радикалів призводити до пошкодження внутрішньоклітинних структур та органоїдів. Рослинні організми забезпечують цілісність структур та гомеостаз за рахунок компартментації вторинних метаболітів у клітинних органелах та хімічні модифікаційні зміни до синтезу менш реакційно здатних сполук [19].

Синтез багатьох фенольних сполук залежить від індукції світла. Відповідно флавоноїди та інші фенольні сполуки у різних органах рослин мають переважно поверхневу локалізацію, а похідні оксикумарини та фенолкарбонові кислоти нагромаджуються у внутрішніх тканинах. Основним місцем локалізації фенолів усередині рослинних клітин вважаються вакуолі. Хлоропласти є основним центром біосинтезу фенольних сполук. Чіткий розподіл вторинних метаболітів спостерігається у видів деревних рослин з масивною кроною. Листки верхніх ярусів крони через ліміт вологи та високу інсоляцію набувають ксерофітних адаптаційних ознак, до яких відносять зменшення розмірів і збільшення кількості продихів на одиницю листової поверхні, потовщення кутикули та, відповідно, потовщення листової пластинки. Затінена внутрішня частина крони дерева за вуглеводним балансом є стабільнішою. Через надмірну інсоляцію, кількість отриманої енергії може призводити до порушень тканин та органів рослин. У процесі еволюції у

рослин формувались структурно-морфологічні, фізіологічні і біохімічні адаптації. Відмічено, що велика кількість фенольних сполук (антоціани, катехіни, флавоноли) мають здатність поглинати УФ-випромінювання та виконують антиоксидантну та фотопротекторну функції, які ґрунтуються на високому окисно-відновлювальному потенціалі вторинних метаболітів.

Експресія генів, які активізують синтез антоціанів та інших фенолів у листках рослин, залежать від інтенсивності сонячного освітлення. Фотоактивні сполуки вторинного походження накопичуються в епідермісі та виконують для рослин роль фотохімічного екрана, який сприяє захисту клітин мезофілу та пласти від надлишкової інсоляції. Отже, високий рівень вмісту в рослинних тканинах флавоноїдів може бути наслідком реакції рослин на інтенсивне УФ-випромінювання.

Найбільш різноманітними за вмістом флавоноїдів є рослинні організми родин Лободові (*Chenopodiaceae*), Вербенові (*Verbenaceae*), Ранникові (*Scrophulariaceae*). Флавоноїди в основному накопичуються в плодах і листках, дещо менше – у стеблах і коренях, при дослідженні виявляються майже у всіх тканинах та органах рослин, що обумовлює особливу їхню роль при регуляції фізіологічних процесів та адаптації рослин до стресорів [3].

Найбільшу кількість флавоноїдів в рослинах відмічено у фазах бутонізації та квітування. Концентрація різноманітних флавоноїдів залежить від характеру синтезованих ароматичних груп, а також від природи та місця їх синтезу. Як вже згадувалося, значна кількість флавоноїдів, антоціанів та лейкоантоціанідинів зосереджена в клітинах епідермісу – через їхню здатність активно поглинати ультрафіолетове випромінювання (280 – 320 нм).

Вміст фенольних сполук у листках берези повислої (*Betula pendula*) змінюється під час вегетації, а по роках може мати індивідуальну стабільність. У межах популяції виявлені дерева з високим рівнем хімічної подібності.

У різних видів рослин якісний та кількісний склад вторинних метаболітів специфічний. Це дає можливість здійснювати ідентифікацію видів рослин, здатність до прояву адаптивних процесів під час дії стрес-фактору. Визначення якісного складу синтезованих продуктів вторинного походження застосовується при систематиці рослинних організмів. Синтез вторинних метаболітів лежить в основі нових систем класифікації рослинних організмів.

Вміст вторинних метаболітів у організмі рослин має значення для систематизування вищих рослин, їх якісні та кількісні зміни є поясненням явища еволюційної адаптації та особливості життєвих пристосувань видів, які закладені у генетичну структуру. Зміна генів, що відповідають за синтез флавоноїдів, як регуляторних, так і структурних є модельною системою, яка дає можливість розуміння еволюційних процесів [19].

Ріст та розвиток рослин знаходяться в залежності від гормональних стимулів. Транспорт та розподіл фітогормонів регулюється вторинними метаболітами, такими як флавоноїди та інші фенольні сполуки.



Фітогормони рослинних організмів характеризуються поліфункціональним впливом, проте основною їх функцією є координація різних ростових процесів окремих клітин, органів та тканин (листіків, плодів, насіння, стебел, коренів) та накопичення асимілятів у центри з найвищою активністю метаболічних процесів. Відмічено прямий зв'язок між синтезом флавоноїдів та архітектонікою рослин. Синтез флавоноїдів призводить до змін у розвитку коренів і пагонів [31].

Вторинні метаболіти рослинних організмів забезпечують основний захист рослин від ураження збудниками захворювань та ушкодження комахами-шкідниками. В той же час селекція більшості культурних рослин здійснювалася шляхом прагнення зниження вмісту речовин вторинного походження, що негативно позначається на їхній стійкості до збудників хвороб та шкідників. Збудниками захворювань рослин виступають віруси, віроїди, мікоплазми, паразитичні гриби, бактерії, нематоди. Переносниками вірусів можуть бути комахи, гриби, нематоди та рослини-паразити.

За концепцією, яка має назву «видовий імунітет» запропонованою М.І. Вавиловим кожен вид рослини має стійкість до більшості потенційно небезпечних патогенних організмів. Проте деякі види паразитичних організмів протягом тривалої еволюції пристосувалися долати видовий імунітет рослин та стали патогенними для них. Такі види паразитів мають здатність уражати лише певні види рослин. Найбільш важливим показником для виявлення патогенності є відповідність між потребами патогена в продуктах харчування та складом поживних речовин рослинного організму. До певних патогенів рослини мають природний – уроджений імунітет. Майже непроникним бар'єром для багатьох патогенних організмів, які не мають спеціальних пристосувань для активного проникнення до рослинного організму є покрови та клітинна стінка. Пошкодження покривів або клітинної стінки рослини може відкрити доступ патогенним організмам до внутрішніх тканин рослини. Основною причиною видового імунітету рослини може виступати її трофічна непридатність для живлення патогена. Харчова непридатність рослин для патогенного організму може бути пов'язана з відсутністю або низьким вмістом у тканинах рослин-живителя речовин, необхідних для нормального розвитку паразита, з наявністю токсичних речовин [8]. У рослинних організмах є велика кількість токсичних речовин, які постійно присутні в тканинах, незалежно від того, зазнавали рослини інфікування чи ні. Деякі з токсинів (сапоніни) завжди є в активній формі, інші токсини містяться у вигляді неактивних попередників у вакуолі (глікозинолати, ціаногенні глікозиди) та активуються при пошкодженні клітин патогенним організмом. Синтез таких токсинів активується ферментами, які активуються при пошкодженні тканин патогенними організмами.

Патогенні організми, подолавши поверхневі бар'єри рослин та потрапивши в провідну систему і клітини, спричиняють захворювання. Особливості розвитку захворювання залежить від стійкості рослини. За рівнем стійкості

рослин поділяють на чотири категорії: надчутливі, чутливі, толерантні та вкрай стійкі – імунні. При взаємодії чутливих рослинах з вірусами, вірус транспортується з первинно заражених клітин по рослині, швидко розмножується та спричиняє різні симптоми захворювання. У чутливих до інфікування рослин є захисні механізми, які обмежують поширення вірусної інфекції. Темно-зелені зони, які утворюються на молодих листках у чутливих хворих рослин, характеризуються високим рівнем стійкості до вірусів. Клітини рослини з темно-зеленими зонами майже не містять вірусних частинок у порівнянні з сусідніми клітинами, які мають світло-зелене забарвлення тканин. Низький вміст вірусів в рослинних клітинах, які мають темно-зелене забарвлення тканин пов'язаний з синтезом в організмі антивірусних речовин. У толерантних рослинних організмах віруси поширюються по всій рослині, але разом з тим розмножуються погано і не спричиняють симптомів захворювання. В надчутливих рослин первинно інфікованих некротизуються уражені вірусами клітини та сусідні клітини, локалізуючи вірус в некротизованих клітинах, тому віруси не мають можливості поширюватись та спричинити захворювання. На дуже стійких рослинах вірус розмножується лише в первинно заражених клітинах, не поширюється по рослинному організмі та не веде до появи симптомів захворювання.

У рослин активуються захисні механізми при інфікуванні їх патогенним організмом. Одним з таких захисних механізмів є реакція надчутливості. При ній відбувається швидка локалізація та загибель інфікованих рослинних клітин разом з патогенним організмом, що забезпечує стійкість рослини. Реакція надчутливості є одним з найбільш ефективних способів захисту рослин від впливу збудників захворювань. Некротизація інфікованих клітин рослини та створення захисного бар'єру навколо відмерлих клітин блокують транспорт інфекційних агентів по рослині, перешкоджають надходженню до патогена живильних речовин, спричиняють елімінацію патогену, призводять до створення сигнальних речовин, антипатогенних ферментів, метаболітів, які активують захисні процеси в сусідніх з ураженими клітинами та віддалених клітинах та сприяють оздоровленню рослини. Некротизація клітин рослин відбувається при запуску генетичної програми смерті та утворення сполук і вільних радикалів, які токсичні для самої клітини і для патогенних організмів. Реакція надчутливості – смерті клітин рослин-живителя закінчується з появою некротичних плям, загибеллю частини клітин рослини та патогену. При некротизації інфікованих клітин надчутливих рослин велике значення має вихід фенольних сполук з центральної вакуолі. Під час реакції надчутливості в некротизованих ділянках тканин створюються механічні бар'єри, які перешкоджають розповсюдженню збудника захворювань далі по рослинному організму. Некротичні зони, які утворюються в уражених збудниками захворювань тканинах, оточуються шаром перидерми, а у самій зоні ураження накопичуються токсичні сполуки, в той час як у живих клітин посилюється міцність клітинних стінок. У багатьох видів рослин при ураженні

грибною або бактеріальною інфекцією відбувається активація синтезу лігніну або калози, ці біополімери забезпечують міцність стінок рослин клітин, запобігаючи проникненню інфекції. Реакцією рослин на ураження патогенними організмами є збільшення вмісту в клітинах жасмонової кислоти. Утворення жасмонової кислоти може бути спровоковане також пораненням рослин або дією еліситорів. Жасмонова кислота активує експресію багатьох генів, продукти яких є важливими для здійснення захисних реакцій рослин. До захисних реакцій відносять синтез тіонінів (білків, які беруть участь у руйнуванні мембран бактерій та грибів), екстенсинів, ферментів, які беруть участь в синтезі фітоалексинів та фенольних сполук. Завершальним етапом реакцій-відповідей рослин на зараження несумісними патогенними організмами є синтез великої кількості речовин вторинного метаболізму та білків, які пригнічуючи діють на розвиток інфекційних агентів.

Фітоалексини – це велика група вторинних метаболітів, які можуть швидко синтезуватись у місці інфікування патогеном та пригнічують його розвиток. Вони синтезуються у рослинних тканинах лише при їх пошкодженні. При пошкодженні рослин патогенними організмами індукується експресія генів, які кодуєть ферменти, що необхідні при синтезі фітоалексинів. Для різних видів рослин характерними є синтез різних хімічних групи сполук, які виконують функції фітоалексинів. Зокрема, у пасльонових – це сесквітерпени, а в бобових – ізофлавоноїди [24]. Токсичні для патогенів пептиди (тіоніни та дефензини) також відносять до хімічної системи захисту рослин. Тіоніни токсичні і здатні призводити до порушення функцій та структури біомембран, особливо вони токсичні для грибів та бактерій і можуть призводити до порушення проникності мембран клітин інших організмів. Дефензини утворюються в рослинах у відповідь на зараження збудниками захворювань. Вони токсичні і здатні змінювати потенціал мембран клітини. На відміну від тіонінів, дефензини нездатні порушувати структуру мембран клітин.

Сполуки вторинного походження забезпечують захист рослин від комах-шкідників. Серед вторинних метаболітів рослин є дуже токсичні, які мають здатність вбивати різні види тварин. Тому тварини уникають рослин, які містять отруйні речовини. Деякі вторинні метаболіти надають рослинам неприємного смаку, що відлякує фітофагів. Наявні в рослинних організмах деякі ефірні олії, ціаногенні глікозиди, терпеноїди та деякі непротеїногенні амінокислоти токсичні для тваринних організмів. Інгібітори ферментів, які беруть участь у процесах перетравлювання їжі комахами є важливими компонентами захисних реакцій рослин. У більшості видів бобових рослин існують білки-інгібітори амілази – ферменту, який сприяє розщепленню крохмалю. Інгібітори ферментів протеаз, які спричиняють порушення травлення у комах-фітофагів при розщепленні білків в процесі перетравлювання їжі. Ці інгібітори ферментів є найбільш вивченими компонентами захисних систем рослин. У комах, які харчуються рослинами, що містять інгібітори протеаз, це призводить до різкого зниження темпів росту

та розвитку, оскільки в їхньому раціоні виявляються відсутні вільні амінокислоти. В той же час у кишківнику комах накопичуються неперетравлені продукти харчування, і це веде до активації у комах чутливих до розтягування механорецепторів, що призводить до появи відчуття насичення. Інгібітори протеаз відсутні в рослинах (винятком є насіння), вони синтезуються при пошкодженні. Створення генів, які кодують створення інгібіторів протеаз, індукуюється механічними пошкодженнями рослини та контролюється системіном – пептидним фітогормоном, який містить амінокислоти та жасмонову кислоту. Жасмонова кислота і її метиловий ефір синтезуються при механічних пошкодженнях клітин рослин з ліноленою кислотою, яка утворюється при розкладанні фосфоліпідів клітинних мембран. Транспортується жасмонова кислота неушкодженими ділянками рослини флоемою, а метилжасмонат транспортується через повітря.

Велика кількість вторинних метаболітів виявляє специфічну біоактивність. Вторинні метаболіти здатні впливати на процеси розвитку та росту рослинного організму. Інші продукти вторинного синтезу виконують функції антифедантів або атрактантів, які захищають рослини від поїдання тваринами. Деякі вторинні метаболіти мають антибіотичні властивості та токсичні для фітопатогенних бактерій і грибів. Рослини використовують продукти вторинного синтезу (кольорові флавоноїди леткі, ефірні олії або тетратерпени) для привабливання комах-запилувачів або інших тварин, які сприяють розповсюдженню насіння рослинних організмів [19].

Продукти вторинного синтезу за функціональним призначенням перш за все є адаптогенами, які тривалий період піддавалися природному добору в процесі еволюції. Якісний склад окремих класів вторинних метаболітів у рослин знаходиться в залежності від природних умов та філогенезу.

Синтез у рослинних організмах захисних сполук у відповідь на дію стрес-фактора пов'язаний з енергетичними витратами і тому часто супроводжується уповільненням швидкості росту. За умов обмежених ресурсів рослини виробляють менше метаболітів захисної дії та мають менше ресурсів для розмноження та росту. Це обумовлює прояву ознак стійкості, які забезпечуються урівноваженими витратами вуглецю між первинним та вторинним метаболічними процесами, забезпечуючи адаптаційні пристосування рослинних організмів до дії несприятливих факторів [1, 20].

Вторинні метаболіти рослинних організмів відносяться до продуктів метаболізму, які не потрібні під час росту і не істотні для виживання. Разом з тим вторинні метаболіти виконують корисні функції та часто захищають живі організми від дії конкуруючих патогенних мікроорганізмів – збудників захворювань або ведуть до пригнічення їхнього зростання. Деякі з вторинних метаболітів токсичні для тварин, тому можуть використовуватися як хімічна зброя. У періоди найбільш активного росту синтез вторинних метаболітів у рослин зазвичай уповільнюється, проте він прискорюється, коли стають доступними резервні матеріали первинного метаболізму.



Основна функція вторинних метаболітів рослин – екологічна: захист від патогенних мікроорганізмів, комах-шкідників, адаптація до несприятливих зовнішніх умов. Оскільки фактори навколишнього середовища значно відрізняються за рівнем впливу для різних видів флори, спектр дії сполук вторинного метаболізму є практично безмежним. Вторинні метаболіти рослинного походження широко застосовуються у ветеринарії та фармакології, адже мають активний вплив на органи та системи тварин і людей. Вторинними метаболітами є деякі важливі антибіотики. Також вторинні метаболіти часто використовуються в харчовій промисловості як підсилювачі аромату та смаку в харчових продуктах. Деякі рослини здатні накопичувати вторинні метаболіти в значній кількості, що дає можливість використовувати їх як сировину при виробництві технічних матеріалів.

### **1.3. Особливості методики визначення стійкості рослин**

Умови навколишнього середовища постійно змінюються, тому відбувається безперервний процес пристосування організму до цих змін [6]. Процес пристосування рослин направлений на збереження гомеостатичної рівноваги організму, його адаптацію до зміни факторів навколишнього середовища. Адаптаційний процес рослинного організму відбувається на молекулярному, клітинному, організменному та популяційному рівнях. Рослинні організми постійно пристосовуються до умов навколишнього середовища, тому адаптивні зміни відбуваються у них протягом всього еволюційного процесу, який базується на створенні нової генетичної інформації, що відповідає за виникнення нових ознак та реалізується протягом існування багатьох поколінь [4, 10]. Адаптаційні зміни, що спостерігаються в рослинному організмі в лабораторних умовах у відповідь на зміни певних параметрів довкілля, називають аклімацією, а ті зміни в організмі, які відбуваються в природних умовах, називають акліматизацією. Пристосувальні адаптаційні зміни, які є відповіддю на зміни навколишнього середовища, що відбуваються практично одразу після дії стрес-фактору, називають миттєва адаптація. Адаптація на біохімічному рівні є проявом особливостей метаболізму організму. Компенсаторною адаптацією називають зворотні зміни в організмі, які спрямовані на відновлення функцій до контрольного рівня функціональних можливостей організму. Певні адаптаційні зміни організму ведуть до виникнення принципово нових властивостей, які дають можливість використання організмом природного середовища. Організм може нормально функціонувати без нових можливостей, проте завдяки новим, отриманим в результаті процесу адаптації, властивостям значно краще пристосовується до умов існування [25]. Адаптація рослинних організмів до різних стрес-факторів навколишнього середовища, є однією з центральних проблем сучасних наук біології, імунології, селекції. Аналіз метаболічних змін, які відбуваються в клітинах організму під час та в результаті пристосування, сприяє розумінню шляхів та

характеру проходження еволюційного процесу [7, 14]. Зміни кліматичних умов та інтенсифікація сільськогосподарського виробництва, яка спричиняє посилення антропогенного навантаження на біосферу, призводить до зниженням агроекологічної надійності рослинництва.

Фактори навколишнього середовища, вплив яких може спровокувати реакцію-відповіді рослинного організму, називають стрес-фактор. При дії стрес-фактору відбуваються пошкодження рослинних організмів, що виявляються на різних рівнях структурної і функціональної організації рослини та мають місце реакції-відповіді, що дозволяють рослинам пристосовуватися до нових умов [8]. Дія абіотичних стрес-факторів може призводити до відносного зниження врожаю (від потенціалу при ідеальних умовах вирощування) може становити від 60 до 82 % залежно від виду сільськогосподарської культури. Надійність нормального розвитку організму виявляється в ефективності його захисних пристосувань, які виявляються у стійкості до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища. В основі стійкості рослин лежать механізми адаптивності, пристосування. Пристосування рослинних організмів до дії несприятливих факторів носить еволюційний характер. Воно відбувається шляхом утворення морфологічних пристосувань, зміни фізіолого-біохімічних процесів та анатомічної будови. В процесі еволюції рослинних організмів, у них виникають та спадково закріплюються різні пристосувальні реакції - у відповідь на зміни зовнішніх факторів. У рослин сформувався ланцюг послідовних періодів активної життєдіяльності та уповільнення росту, найбільш відповідальні етапи індивідуального розвитку, які відбуваються у найсприятливіші періоди року.

Несприятливі фактори можуть діяти тривалий час та здійснювати порівняно короткочасний, але сильний вплив. При довготривалій дії несприятливого фактору середовища у рослин можуть виявлятися специфічні механізми стійкості, а при короткому та сильному впливі – неспецифічні механізми стійкості. Загальну неспецифічну адаптаційну реакцію організму на дію будь-яких несприятливих факторів середовища називають стресом. При невисоких дозах повторювані стреси сприяють формуванню загартовування у рослинних організмів, в багатьох випадках загартовування до одного стресового фактору сприяє підвищенню стійкості організму до деяких інших стрес-факторів. Пристосування рослинних організмів до екстремальних умов на різних рівнях їх організації відбувається неоднаково: чим вищий рівень біологічної організації від клітини до організму, відповідно більша кількість механізмів одночасно задіяно при формуванні адаптації рослин до стрес-фактору. На рівні організму зберігаються всі механізми задіяні при формуванні адаптації, які властиві клітині, але вони доповнюються новими, які виявляються у взаємодії органів по всій рослині. Одним з проявів адаптації до дії стрес-фактору є конкуренція органів відносно забезпечення поживними речовинами та утворення вторинних метаболітів, що дає змогу рослинам в екстремальних умовах сформувати лише такий мінімум генеративних органів,

який дає змогу забезпечити необхідними речовинами для нормального дозрівання. До механізмів захисту рослинних організмів від наслідків дії екстремальних стрес-факторів відносять процес заміни втрачених або ушкоджених органів шляхом регенерації або за рахунок активному розвитку пазушних бруньок. У рослинних організмах при дії несприятливих факторів навколишнього середовища відбувається реакція гормональної системи на екстремальні умови. У результаті може різко зростати рівень утворення етилену та абсцизової кислоти. Ці сполуки гальмують ростові процеси, знижують рівень обміну речовин, сприяють старінню та опаданню органів, ведуть до переходу рослини в стан спокою. Відповідно в тканинах рослин знижується вміст цитокініну, ауксину та гіберелінів. За умов тривалої та сильної дії стрес-фактору у період виснаження рослинні організми гинуть. В основному це організми, які мають низький рівень генетичної норми реакції на відповідний екстремальний фактор. Рослини більш генетично стійкі до окремого стрес-фактору здатні утворювати насіння і, відповідно, загальний рівень стійкості у популяції зростає. У такому випадку на популяційному рівні у відповідь на стрес, як захисний механізм включається добір, який веде до появи більш адаптованих до стресових умов організмів. Ця властивість вироблена у процесі еволюції закріплюється генетично. В районах з несприятливими умовами формуються стійкі дикорослі форми та місцеві сорти культурних рослин.

Характерний для певних рослинних організмів захисний механізм стійкості виявляється лише під час дії екстремального фактору середовища. В результаті дії екстремального фактору настає фаза подразнення, при якій відбувається різке відхилення від норми багатьох фізіологічних властивостей організму та швидке повернення їх до нормального стану. В результаті змінюється інтенсивність обміну речовин та пошкодження внутрішньоклітинних структур організму. Відбувається пригнічення синтетичних процесів в організмі та активізуються гідролітичні процеси і знижується загальна енергозабезпеченість рослини. При надмірній дії стрес-фактору, який перевищує летальний для організму поріг, рослинний організм гине. Проте, якщо дія несприятливого стрес-фактору не досягає граничного значення, у рослинного організму настає фаза адаптації. Адаптовані до дії певного стрес-фактору рослини значно менше реагують на повторну дію екстремального фактору. На процесі адаптації організму ґрунтується процес загартовування рослин. На рівні організму при процесі адаптації відбувається взаємодія між органами рослини. Уповільнене переміщення по рослинному організму води, органічних, мінеральних сполук призводить до загострення трофічної конкуренції між органами, що спричиняє уповільнення ростових процесів, органи розвиваються не повністю, інколи може відбуватись їх скидання (наприклад опадання плодів при недостатній зволоженості).

Внаслідок тривалої спільної еволюції з іншими організмами у дикоростучих форм рослинних організмів виробляються різноманітні захисні механізми, які не завжди спостерігаються в культурних рослин. Природні

механізми стійкості, які спостерігаються у дикоростучих видів рослин мають важливе значення для визначення способів боротьби зі збудниками захворювань сільськогосподарських культур, якими виступають паразитичні-мікроорганізми гриби, бактерії, віруси й рослинні ґрунтові нематоди (фітогельмінти) та рослини-паразити (омела, повилика, заразиха). Захисний механізм рослини, який забезпечує здатність запобігати, обмежувати чи затримувати розвиток збудників захворювань називають стійкістю. Стійкість рослини до дії збудника захворювання може бути неспецифічною, або видовою та специфічною, або сортовою. Неспецифічна або видова стійкість захищає рослину від великої кількості сапрофітних мікроорганізмів. У результаті формування видової стійкості вид рослин може уражатися лише певною кількістю збудників захворювань. Специфічна або сортова стійкість стосується збудників захворювань, які здатні переборювати видову стійкість та уражати рослини. Специфічна стійкість рослин дуже важлива для сільськогосподарських культур, оскільки саме специфічні патогени спричиняють до втрати понад 90% урожаю. Найбільші втрати урожаю спричиняють збудники грибних захворювань. Необов'язкові або факультативні паразити, які ведуть сапрофітний спосіб життя на мертвих залишках рослин, проте можуть уражати живі ослаблені рослини. Необов'язкові паразити добре ростуть на поживних середовищах і уражають рослини багатьох видів. До необов'язкових паразитів відносять збудника сірої гнилі *Botrytis cinerea*. Переважно паразитичний спосіб життя ведуть факультативні сапрофіти на невеликій кількості видів, іноді вони ведуть сапрофітний спосіб життя. Представником факультативних сапрофітних організмів є збудник фітофторозу картоплі *Phytophthora infestans*. Облігатні або обов'язкові паразити не можуть існувати без рослини-живителя, вони вражають рослини близьких родів. До обов'язкових паразитів належать велика кількість грибів-паразитів рослин, зокрема збудник бурої іржі пшениць *Rustinia graminis tritici* та віруси, проте не бактерії. Обов'язкові паразити в процесі сумісної еволюції з рослиною-живителем виробили здатність минаючи захисні механізми потрапляти в тканини рослинних організмів. Разом з тим у рослин-живителів в процесі еволюції виробляються захисні механізми, які запобігають проникненню патогенів у рослинний організм.

На кожному рівні структурно-функціональної організації захисні механізми рослини забезпечуються певними «компонентами», які формують стійкість [15]. Стійкість рослинних організмів забезпечується відновлювальними процесами, які відбуваються на нижчому рівні. Зокрема, стійкість біологічної тканини зумовлена відновними процесами за участі безпосередньо клітин організму, які є структурними елементами тканини. Водночас, функціонування відновлювальних систем рослинного організму є безперервним, поступовим та дискретним, ієрархічним.

Функціонування захисних механізмів рослин по відношенню до стрес-факторів характеризує здатність рослинних організмів повноцінно

здійснювати свої основні життєві функції в несприятливих умовах зовнішнього середовища, а рівень стійкості організму вимірюється у величинах: висока; середня; низька і т. д., та віддзеркалює кількісний показник відповідної здатності. Біологічна стійкість рослинних організмів визначається максимальним значенням стрес-фактору, при дії якого рослини ще здатні утворювати життєздатне насіння, яке забезпечує збереження виду рослини як біологічної одиниці. Біологічна стійкість рослинного організму виражається кількісно в одиницях виміру діючого на рослини стрес-фактору (температури, забезпечення вологою, концентрації речовини в середовищі і т. д.). Агрономічна стійкість рослинних організмів визначається ступенем зниження врожаю корисного продукту або іншого показника господарської цінності рослин, під впливом стресової дії середовища. Вона виражається в частках зміни врожаю рослин під впливом діючого на них стрес-фактору і вимірюється у відсотках або інших одиницях, які характеризують відношення продуктивності рослин при стресі до врожайності культур за відсутності дії стресора. За рівнем стійкості до впливу різних стрес-факторів рослини одного і того ж виду або сорту часто не однакові (приміром зимостійкий вид може бути середньостійким до посухи). При характеристиці сортів рослин за їхньою стійкістю до певного типу екстремального фактору вказується конкретно, до якого стрес-фактору у рослини відмічено стійкість та у якій мірі (висока, середня, низька посухостійкість). Оскільки за різних рівнів напруженості одного і того ж стрес-фактору продуктивність рослин змінюється відповідно по-різному, то при порівнянні агрономічної стійкості різних видів або сортів рослин між собою їх оцінка має проводитися за однакового стресового навантаження. Найвищий рівень біологічної та агрономічної стійкості одного і того ж виду або сорту по відношенню до різних змін в умовах навколишнього середовища, при яких розвиваються рослини, в природних умовах істотно змінюється. Відповідно, для порівняння стійкості різних видів або сортів рослин необхідно орієнтуватися не на абсолютну стійкість, яка змінюється при різних циклах оцінки, а на відносну величину стійкості, яка характеризує відмінності рівня стійкості видів або сортів відносно один одного, при визначенні їхньої приналежності до певних груп стійкості.

Рівень стійкості до дії стрес-факторів є генетично контрольованою і спадкоємною ознакою, яка властива кожному виду, сорту або навіть окремій рослині. Ця ознака є потенційною для рослинних організмів. За оптимальних умов вона прихована, і проявляється лише коли рослина опиняється під впливом стрес-фактору. Для діагностики стійкості рослин однією з необхідних умов є створення певного впливу на досліджувані об'єкти тим стрес-фактором, стійкість до якого визначають. Стресові умови, які створюються для перевірки рівня стійкості рослинного організму називають провокаційним фоном. При оцінці посухостійкості рослини, у яких досліджують рівень стійкості, поміщають в умови водного дефіциту, при оцінці на стійкість до низьких температур рослини витримують при дуже низькій температурі, а при



оцінці на стійкість до ураження збудниками захворювання для рослинних організмів створюються сприятливі для їх зараження умови, які називають інфекційний фон. У деяких дослідженнях стресовий вплив створюється в процесі дослідної роботи з оцінки рівня стійкості до певного стрес-фактору, як один з елементів методу діагностики. Рівень стійкості змінюється кількісно залежно від фази онтогенезу рослинного організму. Зокрема, рівень стійкості найнижчий в молодому віці, коли рослина знаходиться у фазі проростка або сходів, в подальшому він поступово та істотно зростає до фази дозрівання насіння, проте в період формування гаметофіту рівень стійкості рослини дещо знижується. При порівнянні рівня стійкості до стресів різних рослинних організмів необхідно проводити оцінку на однаковому за віковою категорією матеріалі. На рівні фізіологічної організації організму, при репродуктивній фазі та формуванні елементів продуктивності і урожаю, захисні механізми рослинного організму доповнюються взаємодією органів, яка проявляється у змінах розподілу потоків води та транспорті поживних речовин, пластичних речовин, гормонів і т.д., які розподіляються органами рослини в умовах дії стрес-фактору. При проведенні оцінки рівня стійкості рослинних організмів різними методами на клітинному рівні біологічна повторність при відборі проб повинна бути досить велика, для того, щоб якомога точніше відобразити всю популяцію або сорт, а не проаналізувати окрему «крайову ділянку». Для точності досліду повторність повинна бути 3-5-кратною, в кожній повторності проводять аналіз частин рослин з декількох рослин.

При оцінці рівня стійкості рослинних організмів різними методами необхідно підбирати такі умови для дії стрес-фактору, за яких відмінності в стійкості оцінюваних об'єктів між собою мають найбільшу амплітуду. Для сортів різних груп стійкості умови для визначення рівня стійкості бувають різними, що викликає необхідність проводити оцінку паралельно на декількох режимах. У таких випадках при встановленні рівня стійкості рослинних організмів, велике значення має включення в оцінюваний набір сортів також сортів-класифікаторів. Найбільш точне та повне визначення рівня стійкості сорту може надати прямий метод оцінювання стійкості, яка проводиться в польових дослідженнях. При оцінці рівня стійкості в польових умовах враховується депресія врожаю або ступінь виживання рослин під впливом прояву стрес-фактору в природних умовах. Проте, в природних умовах навантаження стрес-фактору змінюється з року в рік, що спричиняє затримку терміну оцінки [17]. Для діагностики рівня стійкості необхідно створити два фони вирощування (оптимальний і екстремальний), що іноді буває важко або навіть неможливо в природних умовах. Широко використовують непрямі методи для масової діагностики стійкості рослин, зокрема різноманітні лабораторні методи, які засновані на врахуванні дії різноманітних стрес-факторів та механізмів адаптації рослин до стресорів. Практична цінність та можливість використання даних, отриманих при застосуванні різних лабораторних методів діагностики стійкості рослин, залежить від того, за

якими параметрами конкретний метод відповідає загальним вимогам. Найбільш вагомими вимогами до методів діагностики стійкості рослин до стрес-факторів є наступні. 1) Диференційна здатність методу визначення стійкості рослин залежить від того, наскільки достовірно та чітко вдається при оцінці розділити за рівнем стійкості близько споріднені об'єкти (види та сорти однієї культури, рослини одного екотипу або однієї сортової популяції). При оцінці стійкості рослин навіть застосування одного методу може надати можливість розділити контрастні види рослин, проте є методи при застосуванні яких буває неможливо диференціювати за групами стійкості різні сорти однієї культури, що знижує рівень придатності методу для селекційних і рослинницьких робіт. 2) При виборі методу для оцінки стійкості рослин вагомою є можливість достовірної оцінки за допомогою обраного методу. Вона залежить від того, наскільки сильно корелює з істинною стійкістю рослин фізіологічна ознака рослин, яка лежить в основі цього діагностичного методу. Ступінь збігу результатів при оцінці одного й того ж набору сортів у повтореннях діагностики залежить від достовірності обраного методу. 3) Обов'язковою умовою при виборі методів оцінки стійкості рослин є наявність в методиці кількісного критерію обліку, придатного для точного інструментального вимірювання, що забезпечує об'єктивність вимірювання на відміну від окомірної та балової оцінок. 4) Технічне забезпечення необхідними засобами для проведення певного методу досліджень обумовлює можливість оцінки стійкості рослин в тому чи іншому закладенні, забезпечуючи інструментальну базу методу. 5) Рівень трудомісткості, тривалість періоду оцінки стійкості рослин та кількість рослинного матеріалу, який піддається перевірці при застосуванні певного методу, значною мірою впливають на можливість застосування методу для масової діагностики великої кількості сортів, або можливості його застосування для визначення характеристики лише невеликої кількості досліджуваних об'єктів.

Аналізуючи характеристики різних методів діагностики стійкості рослин до стрес-факторів, які дають можливість найбільш точно визначити властивий рослині рівень стійкості, можна підкреслити, що одна з основних функцій рослини, яка найбільш повно характеризує цю ознаку, є інтенсивність ростових процесів – регенерації втрачених або ушкоджених органів, інтегрально цей показник відображає сукупність метаболічних змін при будь-якому стрес-факторі. Інтенсивність ростових процесів рослини – здатність її до повернення в нормальний стан розвитку, визначає здатність рослини до пластичності, можливості чітко і швидко реагувати на різні зміни умов навколишнього середовища, саме ця фізіологічна ознака характеризує стійкість рослин до стрес-факторів. Багато сучасних методів діагностики стійкості рослин до дії стрес-факторів базуються на обліку інтенсивності ростових показників. Найбільш часто методи, які дають можливість встановити інтенсивність ростових процесів у рослин, використовуються при оцінці стійкості рослин у фазу проростків, тоді як ростові параметри можна

легко виміряти та порівнювати. Особливо ефективним при вимірюванні інтенсивності росту рослин є застосування рулонного способу пророщування насіння сільськогосподарських культур. При застосуванні такого методу є можливість здійснити автоматизацію обліків та обробки великої кількості параметрів і, відповідно, цінити значну кількість досліджуваних об'єктів. А це дає змогу збільшити масштаби досліджень та зменшити трудомісткість роботи за масової діагностики оцінки стійкості рослин [17].

Сьогодні при дослідженні стійкості рослин до дії стрес-факторів застосовують морфолого-анатомічний, фізіолого-біохімічний методи, а також широко почали застосовувати біотехнологічні методи, які полегшують дослідження. У будь-якій біосистемі, яка здатна до відповіді на стрес-фактор і веде до нормалізації гомеостазу рослини, існує нереалізований в нормальних умовах потенціал стійкості, який проявляється лише за наявності стресового чинника. А у будь-якого біологічного об'єкту, який взаємодіє зі стресором, запускаються первинні механізми – процеси, що запускаються первинною взаємодією стресового фактору з біологічним об'єктом, наслідком чого є утворення так званих «шокових» структур. Тобто структурно-функціональних утворень, які виникають на всіх рівнях інтеграції, що відповідають за гіперадаптивну відповідь рослинного організму. Кожен елемент структурно-функціональної організації рослинного організму забезпечує свій «компонент» стійкості. У рослинних організмів є різні механізми адаптації, які призводять до нормалізації, відновлення метаболічних процесів, залежно від особливостей стрес-факторів. Залежно від рівня організації системи захисту біологічного об'єкту, який піддається впливу стрес-фактору, залежать його адаптивні можливості [33].

Сьогодні у сільському господарстві застосовуються інтенсивні методи використання посівних площ, але тенденція до вирощування на великих площах малого числа сортів тієї чи іншої культури створює ідеальні умови для розвитку хвороб та шкідників в масштабах епіфітотій, здатних спричинити катастрофічні наслідки [26]. Тому проблеми боротьби з шкідливими організмами приймають все більш виражений характер і, відповідно, великого значення набуває вирощування стійких сортів. Використання стійких і адаптивних форм, видів та сортів сільськогосподарських культур, які здатні ефективніше протистояти дії різних стрес-факторів є одним з найбільш надійних і ефективних шляхів захисту рослин, зменшення негативного впливу на довкілля, збереження та збільшення біорізноманіття [8, 23]. Увага до стійких сортів особливо зросла останнім часом через посилення забруднення навколишнього середовища пестицидами. На посівах, де вирощуються стійкі сорти, у багато разів знижується використання інсектицидів і фунгіцидів. Підраховано, що при вирощуванні лише стійких до шкідливих організмів сортів може дати збільшення врожаю сільськогосподарських культур на рівні 20-25%.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 1

1. Большакова М. О. Адаптивні особливості листків ксерофітів. / Большакова М. О., Мусатенко Л. І. Київ : Фітон, 2010. 104 с.
2. Величко Л. Н. Практикум з фізіології рослин / Л. Н. Величко, А. С. Меркушина, Л. В. Чорна. Умань, 2006. 76 с.
3. Власенко М.Ю. Фізіологія рослин з основами біотехнології. / Власенко М.Ю., Вельямінова-Зернова Л.Д., Мацкевич В.В. Біла Церква: БДАУ, 2006. 504 с.
4. Вплив агроекологічних чинників на врожайність пшениці озимої в степовій зоні України / О. Л. Романенко, С. Р. Конова, М. М. Солодушко, С. В. Бальошенко // Агроекологічний журнал. К., 2015. № 1. С. 106–108.
5. Гродзинский Д. М. Адаптивная стратегия физиологических процессов растений. Киев: Наукова думка, 2013. 302 с.
6. Демчук Т. Л. Система конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) / Т. Л. Демчук, І. П. Григорюк, А. Ф. Ліханов // Доповіді НАН України. К., 2012. № 7. С. 144–152.
7. Екологія: підручник для студентів вищих навчальних закладів / кол. Авторів ; за загальною ред. О. Є. Пахомова; художник – оформлювач Г. В. Кісель. Харків : Фоліо, 2014. 666 с
8. Зайцева І. О. Аналіз феноритміки та адаптивних властивостей кленів в умовах інтродукції у Степовому Придніпров'ї / І.О. Зайцева // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. 2015. С. 6–12.
9. Злобін Ю.А. Курс фізіології і біохімії рослин. Суми: Університетська книга, 2004. 463 с.
10. Колесніченко О. В. Біолого-екологічні системи стійкості та адаптації рослин *Castanea sativa* Mill.: монографія / О. В. Колесніченко, І. П. Григорюк, С. М. Грисюк. К.: Компринт, 2012. 334 с.
11. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам / Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. // Физиология и биохимия культурных растений. 2009 Т. 41, № 2. С. 95–108.
12. Колупаев Ю.Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. / Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Киев: Основа, 2010. 352 с.
13. Колупаев Ю.Є. Основи фізіології стійкості рослин: Курс лекцій. Харків, 2010. 121 с.
14. Лук'янова Л.Б. Лабораторний практикум з екології : навчально-методичний посібник. Вид. 2-ге змінене і доповнене. Київ : ТОВ «ДСК – Центр», 2016. 143 с.
15. Макаренко О. А. Физиологические функции флавоноидов в растениях / О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Физиология и биохимия культурных растений. К., 2013. Т. 45, № 2. С. 100–112.
16. Макрушин М.М. Фізіологія рослин. / Макрушин М.М., Макрушина

Є.М, Петерсон Н.В., Мельников М.М. Вінниця: Нова книга, 2006. 413 с.

17. Методологія оцінювання стійкості сортів пшениці проти шкідників і збудників хвороб / С. О. Трибель, М. В. Гетьман, О. О. Стригун та ін.; За ред. С. О. Трибеля. К.: Колобіг, 2010. 392 с.

18. Мусянко М.М. Фізіологія рослин: Підручник. К.: Либідь, 2005. 835 с.

19. Петріна Р.О. Вторинні метаболіти екстрактів калусної біомаси *Delfinium elatum* / Петріна Р.О., Загородня Д.С., Хом'як С.В., Новіков В.П. // Вчені записки ТНУ імені В.І. Вернадського. Серія: технічні науки Том 31 (70) Ч. 2 № 2 2020 С. 34–38.

20. Приседський Ю. Г. Адаптація рослин до антропогенних чинників : підручник. / Приседський Ю. Г., Лихолат Ю. В. Вінниця : ТОВ "Нілан-ЛТД", 2017. 98 с.

21. Разумова С.Т. Екологія рослин з основами ботаніки та фізіології : конспект лекцій. Одеса. 2013. 197 с.

22. Рожко О. В. Стрес у рослин та способи зниження його наслідків. Агробізнес сьогодні. 2017. URL: <http://agrobusiness.com.ua/2017-09-29-05-56-43/item/2524-stres-u-roslyn-tasposoby-znyzhennia-ioho-naslidkiv.html>.

23. Скляр В.Г. Екологічна фізіологія рослин. Підручник. Суми: Університетська книга, 2015. 271 с. 6.

24. Гарнопільська О.М. Фізіологія рослин. Конспект лекцій. Харків: ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2018. 159 с.

25. Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації сільськогосподарських рослин до комплексної дії абіотичних факторів середовища: монографія / О.М. Вінниченко, В. С. Більчук, І. О. Філонік та ін. Дніпропетр. національний університет ім. О. Гончара, НДІ біології. Д.: Нова ідеологія, 2011. 224 с.

26. Хвороби пшениці, поширені в Україні: шкідливість, генетичний контроль та результативність селекції на стійкість / О. Ю. Леонов, В. П. Петренкова, І. С. Лучна та ін. // Селекція і насінництво. Х., 2016. Вип. 109. С. 53–64.

27. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Sci.* 2005, V. 89. № 7. P. 1113-1121.

28. Caldwell, Roger L. Effects of Air Polln on Vegetation. *Progressive Agriculture in Arizona*, 2016. P. 10–11 (<http://hdl.handle.net/10150/300199>).

29. Casperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity?. *Physiol. Plant.* 2004. V. 122. P. 159–168.

30. Kaur N., Gupta A. K. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plant. *Curr. Sci.* 2005. V. 88. P. 1771–1780.

31. Pallardy S.G. *Physiology of Woody Plants*. Third Edition. Elsevier, 2008. 454 p.

32. Hiron A., Thomas P. *Applied Tree Biology*. Wiley-Blackwell, 2018. 422 p.

33. Foyer C. H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 2009. V. 11. P. 861-906.

## Розділ 2

### СПЕЦІАЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ, ПРОСТОРОВА ОРГАНІЗАЦІЯ І ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІСТЬ СЕКРЕТОРНИХ СИСТЕМ РОСЛИН

Вторинні метаболіти у рослинних клітинах зазвичай містяться в спеціалізованих компартментах, переважно у вакуолях. Розподіл вторинних метаболітів може бути локальним, безпосередньо в місцях їхнього синтезу в клітинах і транспортування обмежується переносом із одного органоїда до іншого (наприклад, із хлоропластів у золь до ретикулярної формації або апарату Гольджі, і звідти – до вакуолей). Вторинні метаболіти можуть брати участь як ефектори, фітоалексини, анти- або прооксиданти, виконувати роль субстратів для ензимів, перетворюватись на інші сполуки, полімеризуватись і входити до складу внутрішньо- або екзоцелюлярних структур, як-то полімери лігніну вторинних клітинних стінок, чи нашаровуватись на поверхні клітини у складі кутикули. Часто леткі сполуки виконують функцію репелентів, або атрактантів, іноді - ольфакторів, за якими комахи знаходять рослини, які потрібні їм як кормова база, місце для гніздування або розмноження.

#### 2.1. Спеціалізовані секреторні клітини у листках гіркокаштану звичайного, або кінського каштану звичайного (*Aesculus hippocastanum*)

**Кінський каштан звичайний, або гіркокаштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*)** – велике листяне дерево родини сапіндових, також відомий під народними назвами каштан дикий, каштан білий, горіх кінський, жолузник, гестиня (рис. 2.1.). Гіркокаштан звичайний походить з Греції. В нашій країні це дерево вирощують як декоративну рослину в садах і парках. Кінський каштан звичайний має густу, широку округлу крону та масивний стовбур – справжня окраса багатьох парків [1]. Рослина має чудові великі суцвіття та декоративні плоди.



Рисунок 2.1. Кінський каштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*)

Звичайний кінський каштан – листяне дерево, яке може досягати висоти до 30 м. Рослина живе до 300 років. Дерево швидко росте в молодому віці і утворює короткий, твердий стовбур з круглою і широкою кроною. Товщина стовбура у старих дерев сягає 1 метра. Стовбур з жовтувато-білої деревини і завжди закручений вправо. Він може розвинути вологе ядро. Коренева система



формується потужна, зі стрижневим головним коренем і сильно розвиненим бічним корінням, завдяки чому це дерево досить вітростійке. Пагони товсті і бурувато-сірі з 5-9-смуговим рубцем на листі.

Кора молодих дерев гладка, має світло-коричневий або коричневий колір, з часом може стати трохи червонуватою, а у старих дерев – сіро-коричнева кора, потріскані пластинки якої згинаються і відшаровуються у лусочках. Листки супротивні, довгочерешкові, пальчастоскладні, голі, трохи блискучі та світло-зелені з нижньої сторони з повстяними жилками. Черешок довжиною до 20 см. Окремі листочки, числом 5-7, довгасті, оберненояйцеподібні, довжиною від 10 до 20 см і шириною близько 10 см, загострені спереду.

Квіти у великій кількості білі з червоними цятками, зібрані у верхівкові прямостоячі пірамідальні волоті, які в народі також називають «свічками». Плід зеленого кольору, коробочка вкрита шипами, до 6 см у діаметрі. Насіння 2–3 см у діаметрі, сплющене, блискуче, коричневе, неїстівне для людей [2].

Кінський каштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*) поширена лікарська, медоносна та декоративна культура [6]. У корі гіркокаштана звичайного містяться сапоніни, жирна олія, фітостерин, тіамін, аскорбінова кислота, глікозиди ескулін і фраксин, які, подібно до дикумарину, уповільнюють зсідання крові. Також знайдено речовини, за дією подібні до хініну. В квітках виявлено пектинові і дубильні речовини, флавоноїди, рутин. Плоди гіркокаштана містять жирну олію, сапоніни (24-28 %), дубильні речовини, крохмаль, глікозид ескулін. Сапоніни кінського каштана отруйні для людини і багатьох тварин.

Гіркокаштан звичайний відомий перш за все як декоративна рослина. Це дерево вельми популярне у спеціалістів з озеленення і ландшафтних дизайнерів, оскільки в процесі росту завжди зберігає стрункість стовбура, через що його часто використовують для створення алей, обсаження доріг. Серед інших його переваг слід відзначити невибагливість, стійкість до газопилового забруднення листків, привабливу форму квітів, щільну крону, яка влітку створює затінок, дарує прохолоду і добре затримує потоки забрудненого повітря.

Звичайний гіркокаштан загалом любить глинясті ґрунти, а найкраще почувається на глинясто-піщаних, пористих. Дерево розвивається повільно, на початку росту дає багато бічних паростків. Для пришвидшення розвитку саджанця і підвищення декоративності бічні паростки у нижній частині стовбура видаляють, залишаючи три горішні пагона. Сформовані дерева обрізки не потребують, але якщо така необхідність виникла з санітарних причин, то переносять її добре. Щоб зменшити ризик негативних наслідків, обрізку слід проводити пізньої осені або рано навесні.

Серед недоліків цієї культури слід зазначити схильність до ураження каштановою мінуючою міллю.

Кінський каштан звичайний загалом дерево стійке до ураження комахами, втім воно сильно ушкоджується специфічним шкідником, зокрема

каштановою мінуючою міллю [2, 5]. Пошкодження цим шкідником спричиняє передчасне побуріння і опадання листя, що суттєво зменшує декоративність дерева [7].

При захисті рослин від пошкоджень спричинених шкідниками, важливого значення набуває здатність рослин регулювати синтез вторинних метаболітів і можливість використовувати їх для керування процесами обміну речовин і синтезу біологічно активних сполук [10, 15].

Вторинні метаболіти у рослинних клітинах часто містяться в спеціалізованих компартментах, переважно у вакуолях. Такий розподіл може бути локальним, безпосередньо в місцях їхнього синтезу в клітинах і транспортування обмежується переносом із одного органоїда до іншого (наприклад, із хлоропластів – у золь до ретикулярної формації або апарату Гольджі, і звідти – до вакуолей). Вторинні метаболіти можуть брати участь як ефектори, фітоалексини, анти– або прооксиданти, виконувати роль субстратів для ензимів, перетворюватись на інші сполуки, полімеризуватись і входити до складу внутрішньо– або екзоцелюлярних структур, як–то полімери лігніну вторинних клітинних стінок, чи нашаровуватись на поверхні клітини у складі кутикули. Часто леткі сполуки виконують функцію репелентів, або атрактантів, іноді – ольфакторів, за якими комахи знаходять рослини, які потрібні їм як кормова база, місце для гніздування або для розмноження [14, 16].

Рослини *Aesculus hippocastanum* зазвичай мало пошкоджуються фітофагами, що обумовлено їхньою анатомічною будовою [13, 32] і особливостями біохімічного складу, де особливе значення мають тритерпенові сапоніни і фенольні сполуки (проантоціанидини, флавоноїди, катехіни).

Відповідний комплекс елементів достатньо надійно захищає рослини *Aesculus* від більшості видів комах фітофагів, утім системна стійкість рослин більшості видів і гібридів *Aesculus* є неефективною проти каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella*) із ряду лускокрилих родина молі–строкатки [4, 7] (рис. 2.2.).

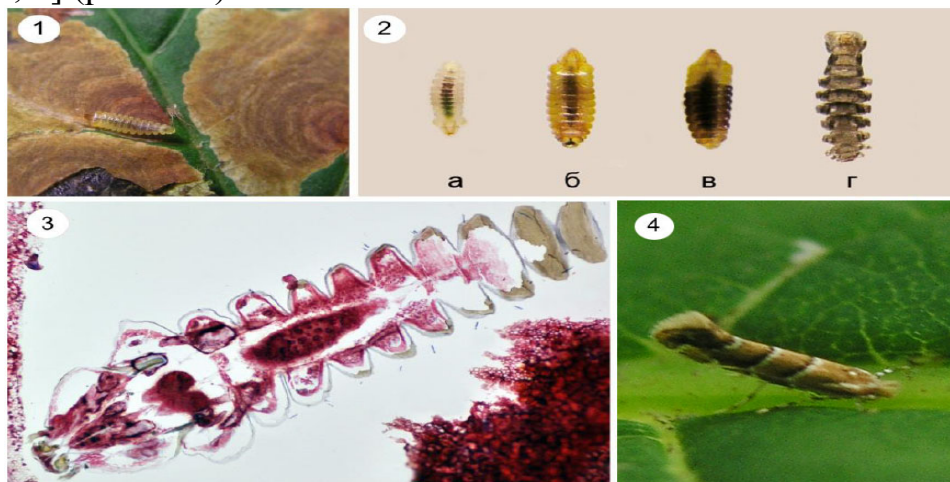


Рисунок 2.2. Стадії розвитку молі каштанової мінуючої: 1-3 – личинка (а, б, в), екзувій (г), 4 – метелик (імаго)

Як було показано вище, нами експериментально доведено, що токсичні для багатьох комах проантоціанидини не є перешкодою для оптимального розвитку гусениць каштанової мінуючої молі. Навіть навпаки, саме висока концентрація фенольних сполук є причиною підвищеної активності цієї комахи.

Пошук кормової рослини для відкладення яєць відбувається за візуальними і хімічними сигналами (атрактантами), які метелики легко розпізнають [27]. За детального вивчення гістохімічної і анатомічної будови листків рослин *Aesculus hippocastanum*, які найбільш уражувалися каштановою мінуючою мілью було звернуто увагу на формування специфічних клітин, які в подібних дослідженнях описані як олійні клітини [32] (рис. 2.3).

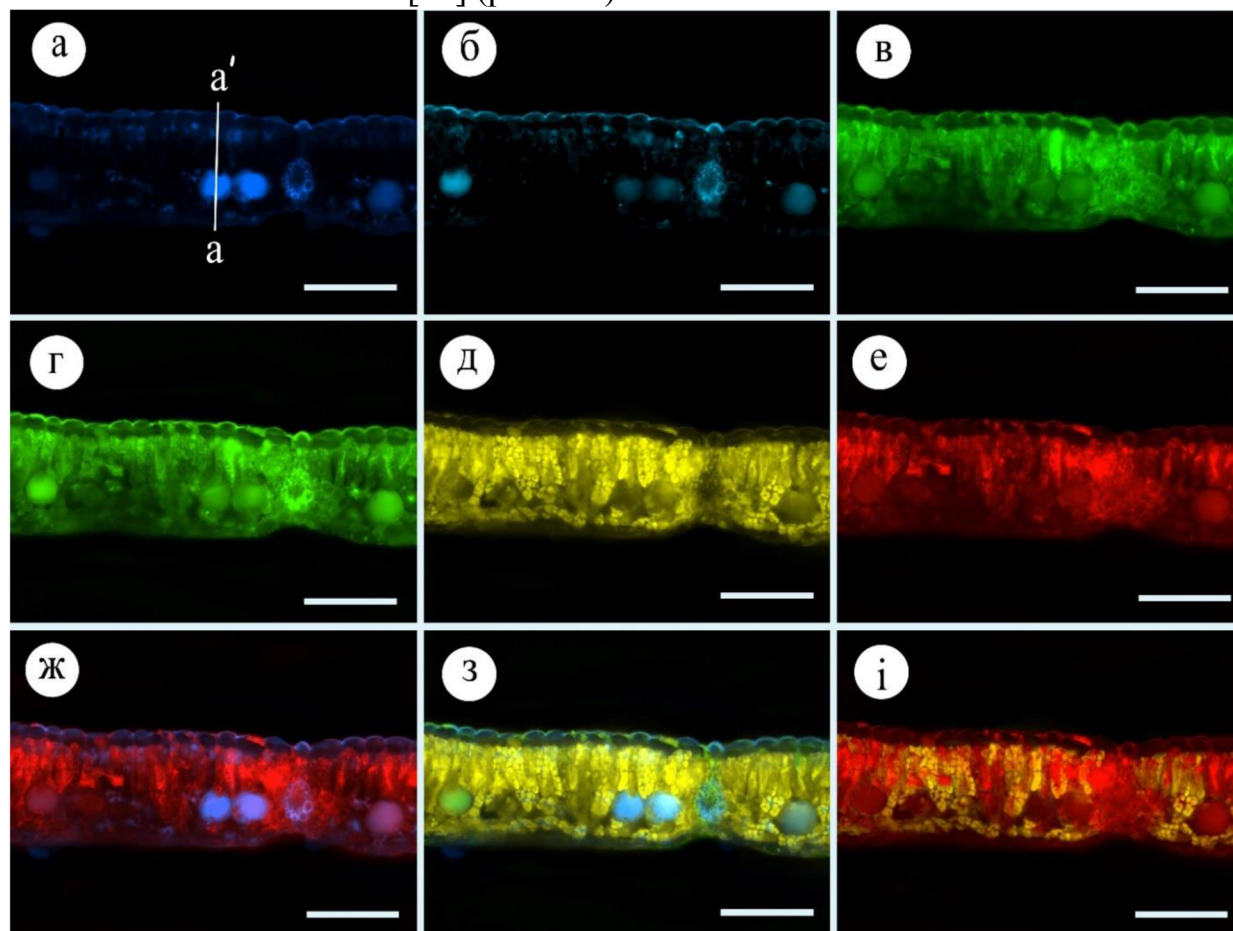


Рисунок 2.3. Автофлуоресценція тканин листка *Aesculus hippocastanum*, що уражується каштановою мінуючою мілью

Форма і вміст спеціалізованих (олійних) клітин суттєво вирізняється від інших клітин мезофілу. Просторово вони розташовані групами і знаходяться на межі стовпчастої і губчастої паренхіми, ближче до нижнього епідермісу.

Оптичне дослідження тканин, клітин та їх наповнення сполуками певного класу методом епіфлуоресценції дозволило виявити досить складну організацію тканин листка і специфічний розподіл оптично активних сполук. Інтенсивна автофлуоресценція в синьому і блакитному спектрах була виявлена в клітинах верхнього і нижнього епідермісу, у клітинах провідних

пучків, а також спорадично в клітинах стовпчастої паренхіми. Висока оптична активність у цьому спектрі характерна для оксикоричних і оксибензойних кислот, а також біополімерів – целюлози і компонентів лігніну. Тому покривні тканини мають інтенсивнішу автофлуоресценцію ніж паренхіма. І навпаки: у зеленому, жовто–зеленому і червоному спектрах яскравіше флуоресціювали клітини мезофілу, що в зеленому спектрі характерно для протеїнів, а в червоному – хлорофілів і каротиноїдів. Олійні клітини виявили інтенсивну автофлуоресценцію в блакитному (420–470 нм) і червоному (620–640 нм), дещо меншу в зеленому (505–555 нм) і жовто–зеленому (546–575 нм) спектрах, що вказує на їхній неоднорідний склад, наявність, крім олій, ще й фенольних сполук, а також білків і вільних амінокислот (рис. 2.4).

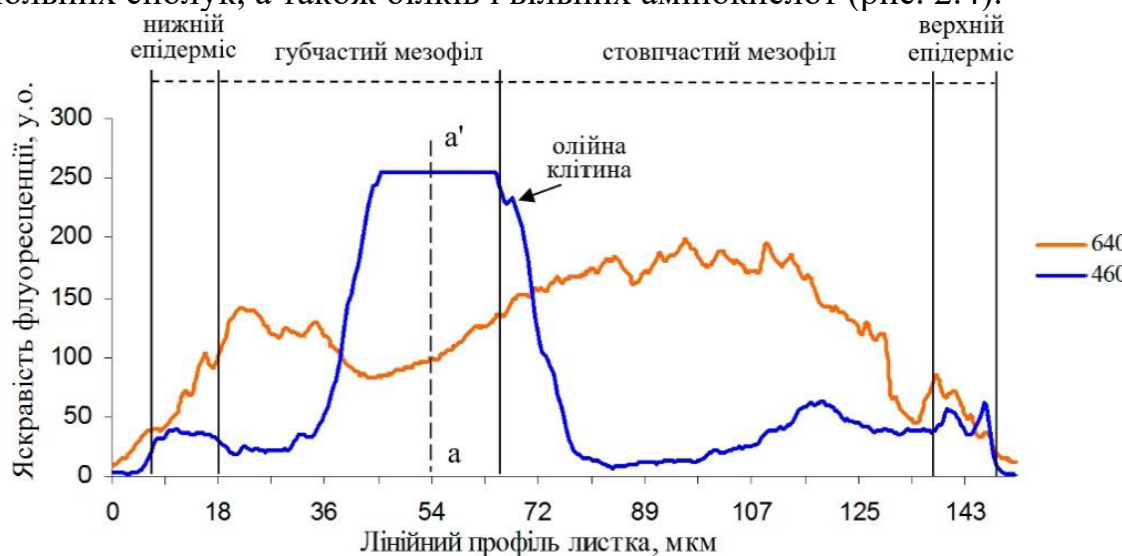


Рисунок 2.4. Профіль інтенсивності флуоресценції тканин листка *Aesculus hippocastanum*, що уражується каштановою мінуючою міллю

Залишається незрозумілим функціональне призначення цих структур. Втім було з'ясовано їхнє походження. Олійні, а точніше секреторні клітини *Aesculus hippocastanum*, утворюються з клітин стовпчастої паренхіми [3]. Клітина паренхіми витягується в базальному напрямку. Одночасно всередині починає утворюватися нова структура за принципом «клітина в клітині». Так усередині паренхімної клітини виокремлюється нова структура зі своєю оболонкою, яка оточена клітинною стінкою материнської клітини. Отже, внутрішня секреторна клітина представляє собою синцитій. Завантаження секреторних клітин відбувається поступово. Водночас верхня частина синцитію продовжує функціонувати як центр активного фотосинтезу. Поступово оболонка нижньої розширеної сферичної структури потовщується і повністю відокремлюється від материнської клітини, хоча її зовнішня клітинна стінка залишається спільною. У мезофілі крім завантажених є також порожні, хоча і повністю сформовані, секреторні структури. Це дає підстави вважати, що секреторні клітини *Aesculus hippocastanum* виконують функцію резервуарів, у яких накопичуються пластичні речовини, певний час



зберігаються і за необхідності переносяться зовні й далі транспортуються провідними пучками в місця, де вони потрібні (рис. 2.5.).

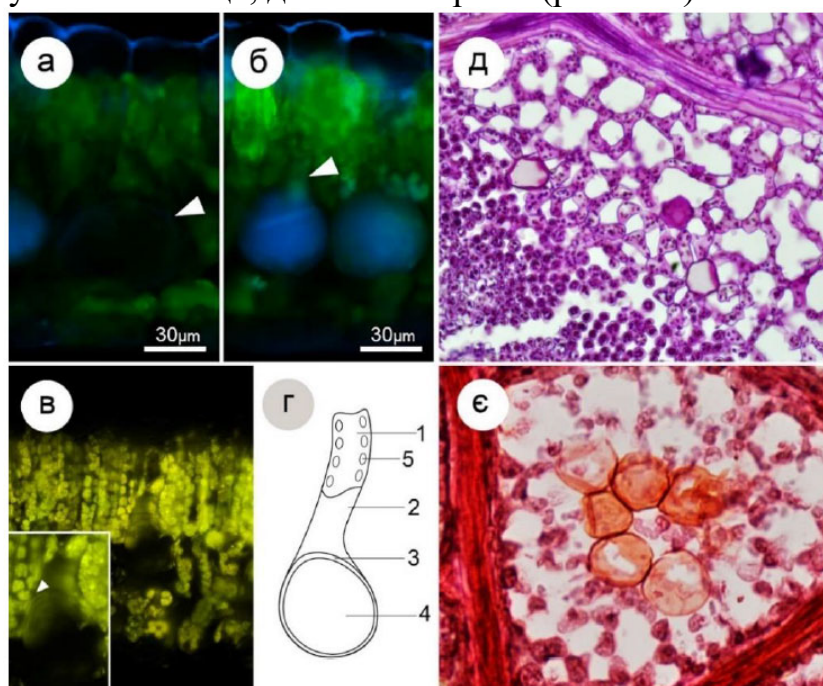


Рисунок 2.5. Локалізація, будова і оптичні властивості секреторних клітин у листках *Aesculus hippocastanum*: невантажена (а) і завантажена (б) секреторна клітина в мезофілі листка, автофлуоресценція пластид і внутрішньої клітинної стінки, що розділяє паренхімну клітину на асиміляційну частину і порожнину, що завантажується секретом; схематичне зображення секреторної клітини (г): 1 – асиміляційна зона, 2 – транзитрна зона, 3 – клітинна стінка порожнини, 4 – секреторна порожнина, 5 – пластида, групи секреторних клітин у зоні стовпчастої паренхіми (д – реакція ШЙК на полісахариди, е – оксифільні сполуки, фарбування сафраніном)

Ці секреторні клітини не виконують захисних функцій від шкідливого впливу каштанової мінуючої молі. Найбільша кількість таких структур виявлена нами саме в рослин, які найбільш уражувались каштановим мінером [8, 9]. У стійких форм і видів *Aesculus* ці структури або майже не виявлялись, або були відсутні. Оскільки в жодній міні не виявлено клітини, які б оминали або ігнорували гусениці, можна з високою вірогідністю припускати, що саме ці клітини є найважливішою ресурсною базою для забезпечення гусениць енергетичними ресурсами [9].

Отже, просторовий розподіл вторинних метаболітів у тканинах листків *Aesculus hippocastanum* може бути більш складним за наявністю та кількістю спеціалізованих клітин, які за складом і функціями можуть істотно вирізнятися від інших клітин, підвищуючи гетерогенність тканин і органів.

Визначення фізіологобіохімічних маркерів стійкості за особливостями розподілу вторинних метаболітів, пов'язаних з реалізацією адаптивного

потенціалу рослин, дозволяє сформувати впорядковану базу знань і має величезне теоретичне і практичне значення для збереження лісових екосистем.

## 2.2. Формування, структурні особливості секреторних систем у пагонах рослин хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.)

Дослідження внутрішньої секреторної системи хмелю, вербозілля лучного проводили на рослинах, які ростуть в лісопаркових насадженнях м. Києва.

Матеріал для аналізу відбирали в різні періоди вегетації рослин. Повторність в цитологічних та гістохімічних дослідженнях – 10-ти кратна. Структурну організацію тканин стебла, листків, суцвіть і квіток хмелю вивчали на постійних мікропрепаратах завтовшки 8-10 мкм. Диференційне фарбування тканин за використання методу світлого поля проводили сафраніном – водним синім за прописом Фурст Г.Г., залізним гематоксиліном за Гейденгайном; ацетофуксином за Паушевою. Для люмінесцентної мікроскопії генеративних органів використовували акридиновий оранжевий (концентрату робочого розчину флюорохрому – 1:30 000, рН ацетатного буферного розчину – 4,7, експозиція фарбування тканин – 2 хв, час промивки препарату у воді – 2 хв). Після промивки препарати дегідратовували та заключали в канадський бальзам.

Активний вторинний метаболізм спеціалізованих секреторних тканин має певну просторову детермінованість. Розглянемо специфіку цього явища на двох видах із добре розвиненими секреторними системами: *Humulus lupulus* L. (хміль звичайний) та *Lysimachia nummularia* L. (вербозілля лучне).

Хміль звичайний (*Humulus lupulus*) росте на багатих ґрунтах ярів, у сирих широколистяних лісах, вільшняках [17] (рис. 2.6.).



Рисунок 2.6. Хміль звичайний (*Humulus lupulus*)

Хміль звичайний (*Humulus lupulus*) багаторічна трав'яниста кучерява рослина родини коноплевих (*Cannabaceae*). Стебло дерев'яниюче витке, гранчасте, горбкувато-шорстке, яке чіпляється за опори, його довжина часом досягає 6 метрів. Ліана має розвинену кореневу систему, здатну зимувати.



Стебло покрите листками. Листки черешкові, супротивні, зверху темно-зелені, гострогорбкувато-шорсткі, зісподу – бліді з жовтими залозками і розсіяними волосками по жилках; нижні листки округлі або яйцевидні, з серцевидною основою, лапчасто-3-5-лопатеві або надрізані, з яйцевидними, загостреними, великопилчастими лопатями, верхні – цілі і на гілках з жіночими суцвіттями чергові. Квітки хмелю одностатеві, дводомні, в дихазіях, зібраних у чоловічих особин волотюватими, а в жіночих – головчастими колосовидними суцвіттями; жіночі рослини утворюють шишкоподібні яйцевидні або видовжені, ясно-зелені суцвіття 2-3 см завдовжки, на ніжках, одиничні або частіше зібрані гроном, пониклі або звислі, з'являються з липня по серпень. На нижній частині шишок розташовані ліпулінові залози, в яких концентруються корисні речовини. Оцвітина чоловічих квіток жовтувато-зелена, п'ятироздільна, з видовженими відстовбурченими або відігнутими частками. Оцвітина жіночих квіток малопомітна, дзвоникувата, після цвітіння одnobічно-плівчасто-розросла і основою охоплює плід, з яким разом і опадає. Плід – яйцевидний стиснений, білувато-сірий, по краю – кілюватий горішок. Цвіте з червня до серпня, плоди дозрівають у вересні. Цінними для медичних та промислових потреб при пивоварінні є жіночі суцвіття – «шишки» і його залозки (лупулін, який одержують при просіванні свіжовисушених стиглих суплідь рослини). «Шишки» хмелю містять ефірну олію (0,2-1,7%), від 5 до 20% гірких речовин (гумулон, лупулон та ін.), холін, аспарагін, органічні кислоти (валеріанова, ізовалеріанова, р-амінобензойна), лейкоантоціанідини та естрогенно діючі речовини. Лупулін містить ефірну олію (1-3%), гіркі (близько 5%) і смолисті (50-70%) речовини, жовтий пігмент, холін, гіпоксантин, аденін, дитерпен когумулон, цератинову й ізопропілакрилову кислоти та алкалоїдоподібну речовину з наркотичною дією. У складі ефірної олії є сесквітерпен гумулен (15-20%), сесквітерпеновий спирт лупаренол, кетон лупарон, від 30 до 50% аліфатичних терпенів (мірцен, фарнезен та ін.), складні ефіри спирту мірценолу (30-40%), аліфатичні терпенові спирти гераніол і ліналоол та лупанон-феноловий ефір, який при гідролізі дає ізовалеріанову кислоту і фенол.

Рослини хмелю звичайного добре відомі завдяки речовинам вторинного метаболізму, що акумулюються в екзогенних секреторних структурах – пельтатних багатоклітинних трихомах залозистого типу, які в репродуктивний період онтогенезу формують на поверхнях листків, суцвіть і суплідь (шишок) так звані «лупулінові зерна» [11, 12, 23]. Секреторні клітини залозистих трихом синтезують терпени, флавонол-глікозиди, гіркі й ароматичні смоли [11, 22, 21, 30, 331]. Накопичення вторинних метаболітів у підкутикулярну порожнину трихом відбувається за допомогою комплексу везикул, які формуються в протопласті секреторних клітин [26]. Другим, і складнішим за організацією та функціональним призначенням, елементом секреторної системи *Humulus lupulus* є розвинута мережа внутрішніх секреторних каналів, молочників та ідіобластів, що містять складні

гетерогенні комплекси продуктів секреції й екскреції [19, 21]. Внутрішня секреторна система рослин поліфункціональна за призначенням [19]. Вона виконує екскреторну функцію, що має важливе значення для пластичного обміну, бере участь у регуляції росту й розвитку, адаптації рослинного організму до стресових чинників [33], захисті від патогенних грибів, мікроорганізмів та фітофагів. Проте саме вона в *Humulus lupulus* залишається недостатньо вивченою. Важливою характерною ознакою хмелю є надзвичайно високий потенціал щорічного відновлення надземної біомаси. На ранніх стадіях вегетації етильовані пагони хмелю інтенсивно ростуть без активного розвитку асиміляційних органів. Пазушні бруньки та апекс закриті чисельними покривними лусочками листового походження, у мезофілі яких закладаються секреторні вмістилища й канали. Під покровом лусочок у пазухах листків закладаються пазушні бруньки майбутніх бічних пагонів. У вакуолях клітин епідермісу та основної паренхіми накопичується значна кількість пігментів – антоціанів, які за наявними даними [11] представлені переважно пеларгонідином. У молодих листках хмелю закладаються спеціалізовані терпеноїдогенні структури, секреторні канали, в яких містяться флабофени, терпени, таніни та інші гетерогенні сполуки фенольної природи.

Існують різні погляди на призначення секреторних каналів і вмістилищ у вищих рослинах. Функція, яку виконують секреторні канали, пов'язана з інтенсивним метаболізмом паренхімних клітин на стадії інтенсивного росту. Вони можуть виконувати функцію локалізації речовин, які є побічними кінцевими продуктами метаболізму, екскретатами. Ізоляція баластних ергастичних речовин дозволяє рослині підтримувати оптимальний фізіологічний баланс, який забезпечує потрібний для життя рослини гомеостаз. Однак продукти секреції рослин можуть поновлюватися, тобто залучатися рослинним організмом до пластичного обміну, синтезу нових речовин, потрібних рослині. Терпени і їхні похідні здатні виконувати й нефізіологічні функції: захищати рослину від поїдання та ураження патогенними організмами. Секреторні терпеноїди мають фунгіцидні та бактерицидні властивості, активно утворюючись у швидкорослих молодих пагонах, вони забезпечують надійний захист меристемам та незрілим тканинам від сонячного опромінення, надмірної транспірації, значних перепадів добових температур та шкодочинної дії фітопатогенних грибів і бактерій. У процесі розвитку вегетативних органів хмелю звичайного кількість секреторних каналів і вмістилищ у молодих листочках і основній паренхімі пагону найбільша. У паренхімі молодих листочків та стеблах спостерігається інтенсивна диференціація клітин, у результаті якої формується секреторна система.

За особливостями генезису можна виділити три типи секреторних каналів: лізигенні, схізогенно–лізигенні та схізогенні (рис. 2.7). За розмірами секреторні канали можна поділити на крупні – 35–55 мкм; середні – 20–30 мкм і дрібні – 10–15 мкм. За морфологічною складністю – одноклітинні

(ідіобласти) та багатоклітинні, з яких поступово утворюються прості нерозгалужені або розгалужені трубки, що виникають шляхом комбінації інтрузивного та симпластного росту клітин. За біохімічними компонентами та консистенцією секрету: терпеноїдні, смоляні, флобафенові та інші.

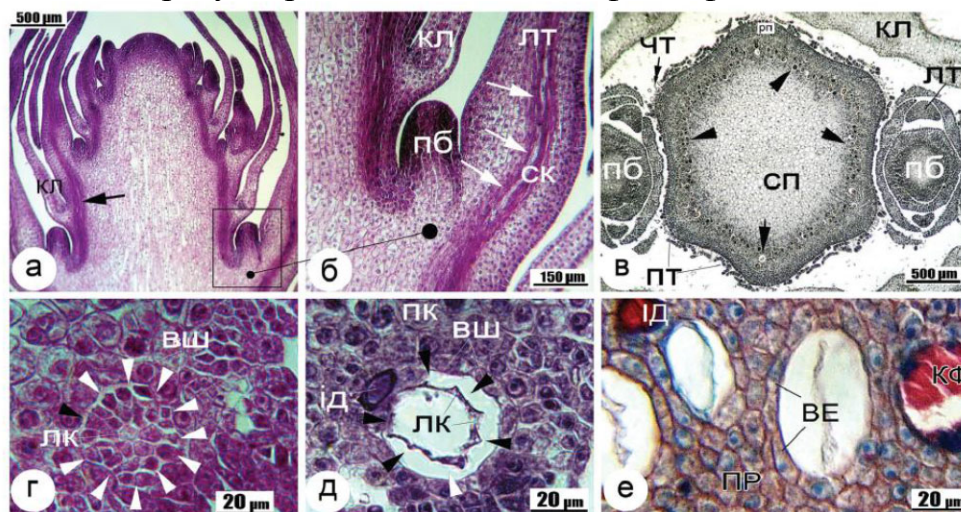


Рисунок 2.7. Анатомічна будова апекса (а), молочника молодого листка (б), етіольованого пагона (в) і процес формування схізогенно–лізигенного каналу (г, д, е) у стеблах хмелю звичайного *Humulus lupulus*: ПБ – пазушна брунька; ІД – ідіобласт; ЛК – лізис клітин у порожнині каналу; ВШ – шар клітин, який утворює секреторний епітелій; ВЕ – епітелій, що вистилає секреторний канал; КФ – конденсовані феноли; МП – міжклітинна порожнина; КП – клітини паренхіми; ПП – провідний пучок; ЛМ – листковий примордій; СП – серцевинна паренхіма; РП – ребро пагона; КЛ – криючий листок; ЛТ – асиміляційний листок

Організація секреторних вмістилищ розпочинається з того, що в паренхімі кори виокремлюється група ізодіаметричних клітин діаметром 10–12 мкм. Міжклітинний простір у центральній групі клітин швидко збільшується, у результаті чого симпластний зв'язок між ними порушується. Центральні клітини зменшуються в розмірі. У доцентровому напрямку розпочинається лізис клітин. Першим у клітинах руйнується ядерний апарат, потім – клітинна оболонка. У той же час периферійна група клітини витягується й утворює щільно зімкнуте округле або овальне кільце діаметром 35–60 мкм. Так утворюється тонкошаровий однорядний секреторний епітелій, клітини якого характеризується густою зернистою цитоплазмою, тонкими целюлозними стінками. Важливо те, що за нашими спостереженнями, синтез та екстракція продуктів метаболізму з клітин епітелію в порожнину каналу синхронізована з лізисом клітин центральної групи. Іноді в порожнині секреторного вмістилища залишалися окремі клітини з морфологічно неушкодженими ядрами. У більшості досліджуваних зразків у незрілих каналах вміст секрету був незначним.

Оскільки формування секреторних каналів такого типу відбувається в процесі лізису клітин із одночасним утворенням схізогенних порожнин, то за походженням їх можна вважати схізогенно–лізигенними. З часом в цілком сформованих листках та дещо здерев'янілих пагонах секреторна система частково, або повністю трансформується. Клітини секреторного епітелію поступово вакуолізуються і збільшуються в розмірі. У центральній жилці молодих листочків діаметр вмістилищ збільшується до 16–30 мкм, у корі жилок другого порядку – до 10–18 мкм. Структурно секреторні вмістилища пластинок листків не мають чітко вираженої диференціації. Секреторний епітелій поступово втрачає спеціалізовані ознаки. У деяких вмістилищах клітини епітелію зовсім не відрізняються від основної паренхіми ні розмірами, ні структурою. Вони втрачають ядра, сильно вакуолізуються і вже не здатні виділяти секрет. На фоні деградації клітин секреторного епітелію в корі здерев'янілих пагонів збільшується загальна кількість ідіобластів та вмістилищ з гетерогенним вмістом. Більшість ідіолітів – це густа смоляниста речовина жовто–коричневого або бурштинового забарвлення (рис. 2.8.). Проксимальна аксіальна зона розташована в центрі апексу, з якої утворюється колонка – попередник серцевинної меристеми. Отже, просторове положення і функціонування внутрішньої секреторної системи молодих пагонів хмелю звичайного синхронізовано в часі з морфогенними шарами клітин апексу. З плином часу секреторна система перетворюється на систему резервуарів, в яку депонуються ергастичні речовини та побічні продукти вторинного метаболізму. За розміром крупні канали створюються схізогенно–лізигенно, середні, як правило, – лізигенно, дрібні – схізогенно. Довжина секреторних клітин 9–12 мкм або 15–20 мкм, ширина 20–22 мкм або 15–17 мкм.

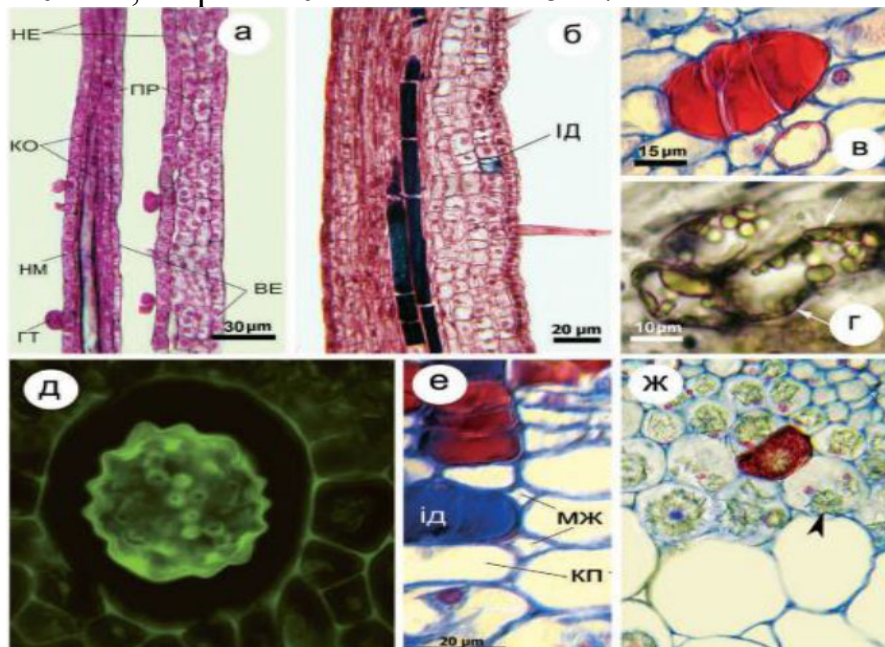


Рисунок 2.8. Секреторні канали та ідіобласти (ід) в пагонах (а), приквітниках (б), кореневищах (в) та насінних зачатках (г), автофлуоресценція цистоліта (д), ідіобласти кореневища (е) хмелю звичайного: ко – секреторні



клітини обкладинки; ск – секреторний канал; тр – головчастий трихом; не – епідерміс адаксиальної поверхні; ве – епідерміс абаксиальної поверхні прилистка (зліва) та асиміляційного листка (справа), мж – міжклітинник, кл – клітинна паренхіма

За консистенцією внутрішнього секрету можна виділити канали з вмістом твердих та м'яких смол, а також – із рідким умістом.

Гістохімічний аналіз пагонів та кореневищ хмелю звичайного *Humulus lupulus* виявив просторову гетерогенність вмісту біохімічних сполук у горизонтальному профілі трубок секреторних каналів. Секреторні компоненти відрізнялись за консистенцією, розміром конкрецій, характером диференціального забарвлення гістохімічними реагентами. Флуоресцентний аналіз секреторних каналів показав, що на початкових стадіях їхнього формування для клітин епітелію характерна активна автофлуоресценція (рис. 2.9, а–в).

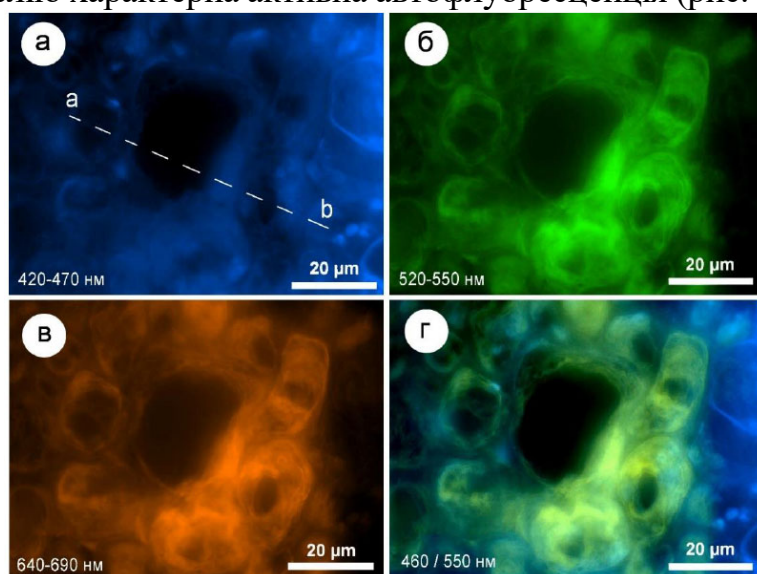


Рисунок 2.9. Автофлуоресценція клітин епітелію секреторного каналу *Humulus lupulus* (на поперечному зрізі) за використання оптичних фільтрів: а – 420–470 нм; б – 520–550 нм; в – 640–690 нм; г – комбіноване зображення флуоресценції секреторного каналу (а–б – лінійний профіль аналізу інтенсивності флуоресценції, у.о.)

У цитоплазмі клітин чітко виявляється шарувато–сітчаста структура, яка має яскраву флуоресценцію в зеленому (520 нм) і червоному (640 нм) спектрах (рис. 2.9, б–в).

Відомо, що активний синтез терпеноїдів в епітеліальних клітинах пов'язаний із функціонуванням агранулярного ретикулуму, який зазвичай слабо розвинений у рослинних клітинах. Терпеноїдні клітини різних видів рослин, які розташовані в різних органах і тканинах у разі переходу до спеціалізованих секреторних функцій набувають однотипної ультраструктури. Її характерною ознакою є значно розвинутий агранулярний ретикулум, зазвичай представлений мережею трубок. За використання

синього світлофільтру (420–470 нм) в клітинах епітелію секреторних каналів та паренхіми, що їх оточує виявлена автофлуоресценція речовин (рис. 2.9, а), які за спектром емісії [25] можуть бути визначені як поліфенольні сполуки. Показано, що їхній розподіл у цитоплазмі клітин має дифузний характер. Порожнина секреторного каналу не містить речовин, які здатні до флуоресценції. За властивістю хроматину інтенсивно поглинати ультрафіолет у клітинах епітелію чітко виявляли одне, іноді два ядра (рис. 2.9, г). Нерівномірність інтенсивності флуоресценції вторинних метаболітів у клітинах епітелію вказує на просторово–функціональну асиметрію схізогенно–лізигенних секреторних каналів, яка пояснюється особливостями транспорту до них речовин–попередників. Найбільший вміст речовин, здатних до флуоресценції, виявлено нами у клітинах, що розташовані біля ситоподібних трубок та клітин супутниць. Інтенсивність їх флуоресценції в синьому, зеленому і червоному спектрах була у 2,5–3 рази більшою, аніж у клітин діаметрально протилежного краю (рис. 2.10).

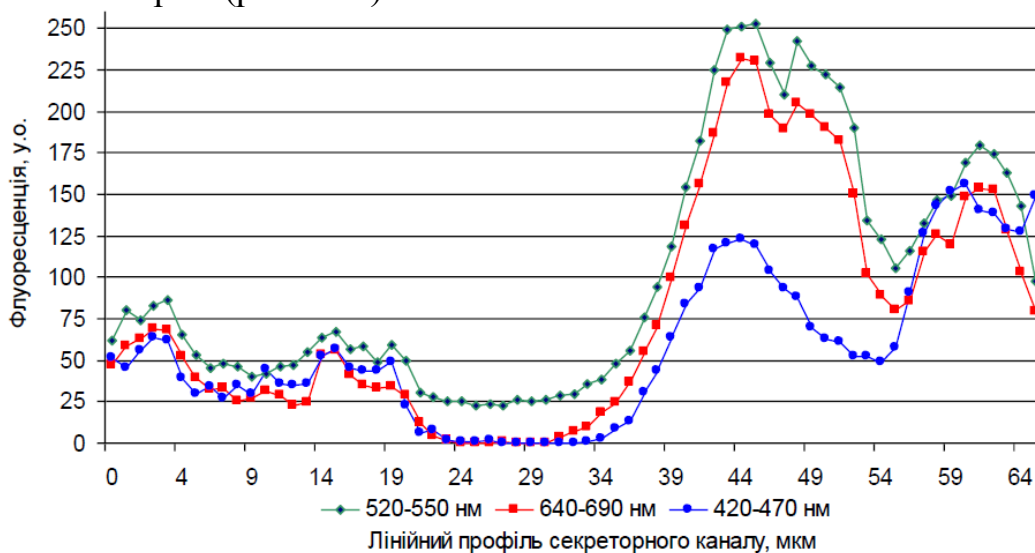


Рисунок 2.10. Автофлуоресценція клітин схізогенно–лізигенного секреторного каналу хмелю звичайного *Humulus lupulus* на початкових стадіях його функціонування

Відомо, що синтез терпеноїдів і флавоноїдів у клітинах рослин відбувається з пірувату, який утворюється в процесі гліколізу [11]. Первинним субстратом для синтезу фенольних сполук є глюкоза, синтез якої відбувається в хлоропластах. У клітинах первинної кори, де формуються секреторні канали, хлоропласти відсутні.

Отже, в етиольовані пагони вуглеводи постачаються судинами ксилеми, переважно, з кореневища, в якому вони накопичуються у попередні роки. Латерально цукри переміщуються симпластом від клітин серцевинних променів до паренхіми флоєми, звідки вони надходять до клітин секреторного епітелію. У зрілих пагонах за транспорт вуглеводів відповідають елементи флоєми [19]. За результатом гістохімічного аналізу, в молодих



пагонах хмелю найбільший вміст крохмалю було виявлено в клітинах паренхіми, які просторово є ближчими до ситоподібних трубочок і секреторних каналів. Продукти вторинного метаболізму, що нагромаджуються в клітинах епітелію, поступово евакуюються в порожнину каналу через тонкі клітинні стінки (рис. 2.11.). Після повного завантаження каналу цитоплазма секреторних клітин втрачає характерну для неї шарувато-сітчасту структуру. Інтенсивне поглинання ультрафіолету ядрами не виявляється. Часткова або повна деградація хроматину, а надалі і руйнування ядерного апарату в деяких клітинах епітелію призводить до незворотної секреторної дисфункції. Інтенсивність флуоресценції клітин у синьому спектрі зменшується вдвічі і має дифузний характер. У внутрішніх клітинних стінках епітелію нами встановлено значне збільшення вмісту целюлози, яка також має здатність до флуоресценції у фіолетовому спектрі (макс. 420–430 нм) [25].

Після завантаження секреторного каналу флуоресценція його вмісту пропорційно збільшується і стає наближеною до інтенсивності флуоресценції епітелію на стадії найактивнішого синтезу терпенів, флавоноїдів та інших фенольних сполук.

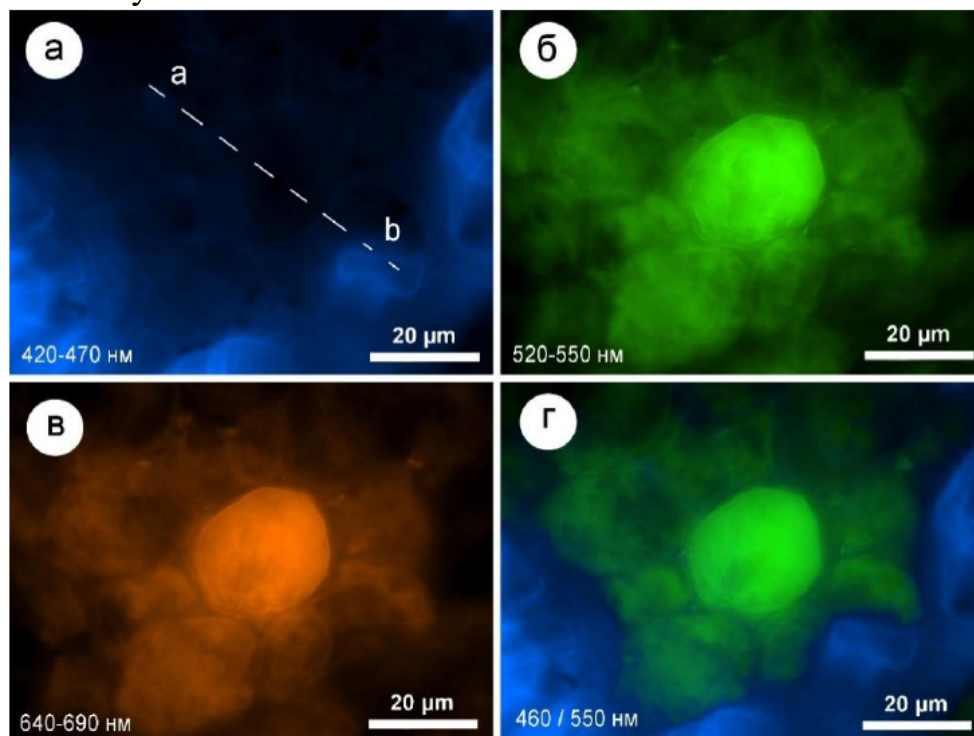


Рисунок 2.11. Автофлуоресценція завантаженого секреторного каналу *Humulus lupulus* (поперечний зріз) за використання оптичних фільтрів: а – 420–470 нм; б – 520–550 нм; в – 640–690 нм; г – комбіноване зображення секреторного каналу (а–б – лінійний профіль аналізу інтенсивності флуоресценції, у.о.)

У паренхіми первинної кори і секреторних клітинах інтенсивність автофлуоресценції вторинних метаболітів у зеленому і червоному спектрах майже повністю збігається (рис. 2.12). Мікроскопічний аналіз листків хмелю звичайного *Humulus lupulus* показав, що в стовпчастій та губчастій паренхімах

також нагромаджуються речовини фенольної природи, котрі здатні до автофлуоресценції. Основними центрами синтезу флавонол-глікозидів є хлоропласти. Вміст цих поліфенолів у мезофілі листкових пластинок із часом збільшується, і вони повністю маскують хлоропласти. Максимум поглинання ультрафіолету флавонол-глікозидами знаходиться в діапазоні 230–330 нм, тому вони ефективно захищають листки від шкідливого впливу ультрафіолету. За інтенсивним опроміненням флавонол-глікозиди люмінесцюють у синьому та синьо-зеленому спектрах, можливо, виконуючи функцію трансформації і двоступінчастої передачі енергії сонячного світла до хлоропластів у спектрі, прийнятному для хлорофілу.

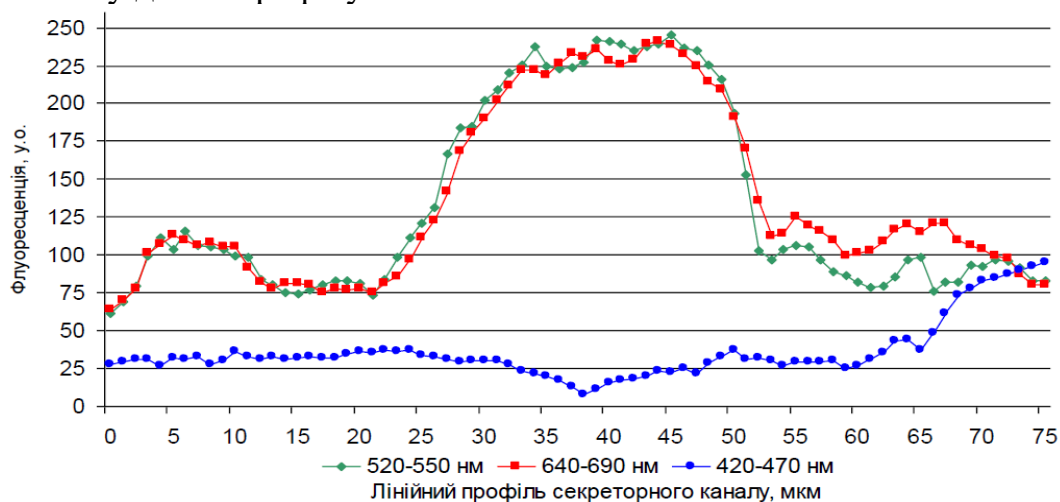


Рисунок 2.12. Інтенсивність автофлуоресценції клітин завантаженого секреторного каналу *Humulus lupulus*

Отже, на початку розвитку пагонів хмелю звичайного *Humulus lupulus* функціональна активність молочників, секреторних каналів і клітин у молодих листках та основній паренхімі стебла є найвищою. З часом у цілком сформованих листках, дещо здерев'янілих пагонах і кореневищах секреторна система частково, або повністю трансформується. За інтенсивністю флуоресценції було показано, що кількість фенолів у мезофілі листків набагато більша, аніж у центральних та бічних жилках другого і третього порядків.

В онтогенезі рослини клітини епітелію секреторних каналів поступово вакуолізуються і збільшуються за розміром. Вони втрачають ядра і поступово стають не здатними виділяти секрет. Епітелій з часом втрачає спеціалізовані ознаки. У деяких вмістилищах його клітини зовсім не відрізняються від основної паренхіми за розмірами і структурою (рис. 2.13).

На фоні загальної деградації клітин секреторного епітелію у вторинній корі здерев'янілих пагонів збільшується кількість ідіобластів та нечленистих молочників із гетерогенним вмістом. У більшості ідіолітів їх внутрішній склад представлений густими смолянистими речовинами (переважно флобафенами). Будова і функції внутрішньої секреторної системи пагонів *Humulus lupulus* синхронізовані з пластичним обміном, який залежить від фази розвитку рослини.

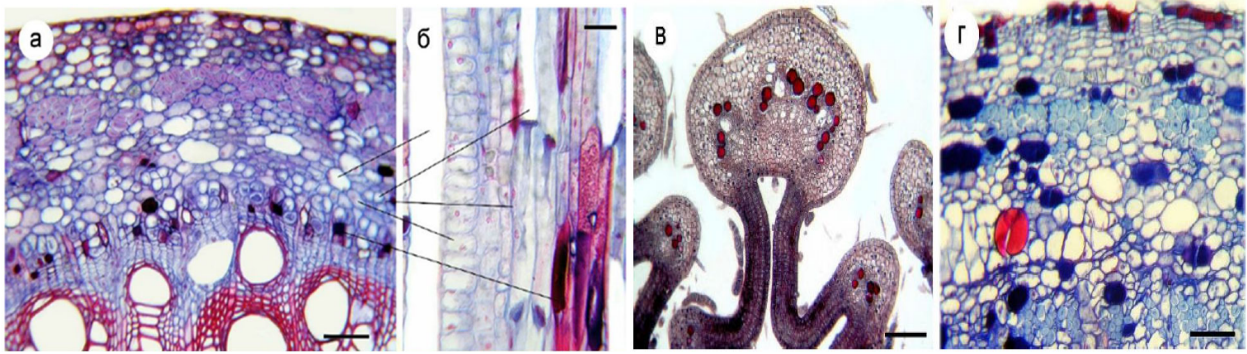


Рисунок 2.13. Просторове розміщення та організація секреторних структур стебла – а, б (лінійка – 60 і 35 мкм), молодого листка – в (лінійка – 100 мкм) і кореневища – г (лінійка – 60 мкм) *Humulus lupulus*

На стадії формування плодів у пагонах цілком сформованих рослин секреторні канали, молочники й ідіобласти поступово перетворюються на систему екскреторних резервуарів, куди депонуються ергастичні речовини та побічні продукти вторинного метаболізму. У рослин хмелю звичайного *Humulus lupulus* формується складна за будовою і динамічна за розвитком секреторна система, функція якої змінюється протягом одного вегетаційного періоду.

### 2.3. Структурно–анатомічні особливості і секреторні системи пагонів вербозілля лучного (*Lysimachia nummularia* L.)

Вербозілля лучне *Lysimachia nummularia* L.– багаторічна рослина з роду вербозілля родини мирсінових з родини первоцвітних (*Primulaceae*), що зазвичай росте в тінистих лісах, заплавах лук, по берегах річок, серед чагарників, у вологих місцях. Вербозілля лучне має сланке стебло довжиною 30-50 см, що вкорінюється у вузлах, звичайно не гіллясте і голе. Стебло вербозілля лучного вкрито чисельними трихомами різної будови (рис. 2.14.). Листя вербозілля лучного на коротких черешках, супротивні, округлояйцеподібні або округло-овальні, тупі або загострені. Квіти двостатеві, одиничні, розташовані по одному в пазухах середніх листів, досить великі, золотисто-жовті, всередині з бурими залозистими крапками. Віночок квітки вербозілля п'ятироздільний, має жовтий колір. Плоди у вигляді коробочки, які розкриваються стулками. Цвіте вербозілля лучне у червні – липні. Плоди дозрівають у серпні – вересні [6].

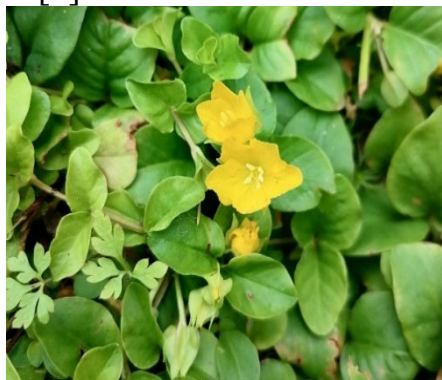


Рисунок 2.14. Вербозілля лучне (*Lysimachia nummularia* L.)



Вербозілля лучне відносять до лікарських рослин. Вербозілля лучне містять сапоніни, дубильні речовини та аскорбінову кислоту, якої у квітках приблизно 880 мг%, а в листі – майже 1200 мг% [6].

На анатомічному рівні у рослин вербозілля лучного виявляють структурну гетерогенність тканин, яка є важливою складовою інтегральної системи екологічної пластичності виду. Гетерогенність тканин пов'язана з активним синтезом специфічних метаболітів і їх локалізацією. У результаті гістохімічних досліджень було з'ясовано, що накопичення фенольних сполук (кон'югатів оксикоричних кислот, флавоноїдів, танінів), тритерпенових сапонінів та терпеноїдів у тканинах листків і стебел відбувається на самих початкових стадіях розвитку. Перші клітини, що густо заповнюються поліфенольними сполуками (ідіобласти), виявляються в колонці апікальної меристеми на відстані 180–250 мкм від верхньої точки. У стеблах ювенільних пагонів утворення організованих груп ідіобластів виявляється в зоні серцевинної паренхіми. Перші головчасті трихоми залозистого типу, які є видоспецифічною ознакою вербозілля лучного, формуються на адаксіальній і абаксіальній поверхнях примордіальних листків. Кількість трихом на одиницю площі є достатньо варіабельною ознакою, яка суттєво залежить від умов місцезростання рослин. За нашими даними на адаксіальній поверхні листків кількість трихом була зазвичай дещо більшою. Необхідно зазначити, що фізіологічне та екологічне значення мікроморфологічних структур, на нашу думку, є досі відкритим питанням. Екскреторна функція клітин залозистих головок трихом здатна забезпечувати захист рослин від фітофагів, утім не можна виключати й інших функцій, у тому числі екстрацелюлярного та дальньодистантного сигналіngu.

Після гарячого гідролізу мікропрепаратів (10 хв у 1 N HCl за 60 °C) апікальних меристем пагонів із наступним фарбуванням реактивом Шифа в тангентальних стінках клітин–ніжок трихом виявилось значне накопичення полісахаридів, які після гідролізу утворили альдегідні групи (рис. 2.15).

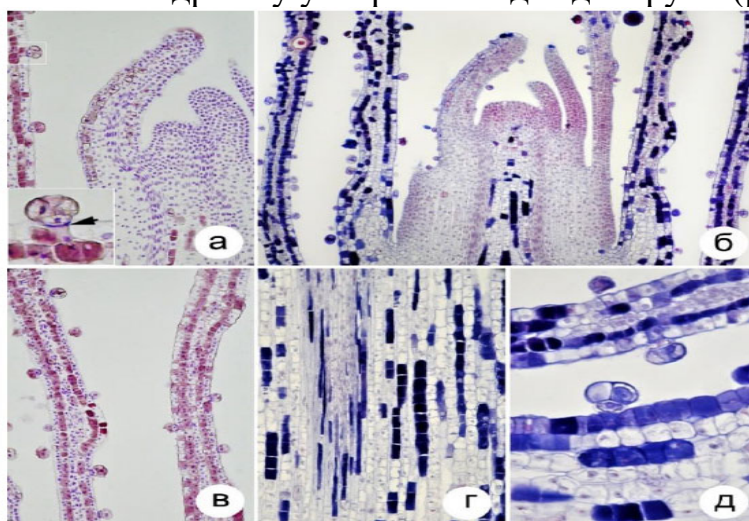


Рисунок 2.15. Структурна та біохімічна гетерогенність клітин ювенільних пагонів вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* (парк

«Феофанія», м. Київ): а – пазушна брунька пагона і відкладання специфічних полісахаридів на базальній поверхні тангентальної стінки клітини–ніжки (фарбування ДНК реактивом Шифа за Фьольгеним); б – апікальна меристема з ювенільними листками (фарбування сафраніном–водним синім); в – початкові стадії акумуляції поліфенольних сполук у клітинах мезофілу (фарбування реактивом Шифа – сафраніном); г – гістохімічна гетерогенність первинної кори і флоєми ювенільного стебла); д – формування головчастих трихом початкових стадій розвитку листків (г, д – фарбування сафраніном–водним синім)

Значне накопичення біополімерів на базальних стінках клітин, ймовірно, пов'язано з бар'єрною функцією, що створює гістохімічні перешкоди та регулює відток продуктів вторинного метаболізму з центру їхнього синтезу в секреторних клітинах головчастих трихом у клітини мезофілу. Контент залозистих тканин вегетативних органів виявився достатньо різноманітним. Більшість клітин була наповнена поліфенольними сполуками, що інтенсивно фарбувались основними і кислими барвниками. Також траплялись трихоми з секретом бурштинового забарвлення (не розчинні в етанолі, бутанолі і ксилолі), які фарбуються сульфоіндигокарміном.

Наприклад, виявлено окремі випадки, коли листки, розташовані дистальніше, мали меншу товщину листкової пластинки, хоча за хронологією вони закладались раніше. На підставі залежності між показниками вмісту фенолів і розмірами клітин мезофілу було зроблено припущення, що в загальному пулі вторинних метаболітів листків представлені індивідуальні сполуки з властивостями регуляторів росту. За умов збільшення їхньої концентрації у листках процеси розтягнення клітин мезофілу вповільнювалися. Як наслідок – листкова пластинка ставала тоншою, що характерно для затінених рослин. Цікавими також є факти нерегулярного поділу клітин мезофілу в метамерах (зменшення товщини листкової пластинки і подальше її збільшення в наступних метамерах). Цей ефект може бути пов'язаний з високою чутливістю меристем до впливу чинників навколишнього середовища.

Формування схізогенних вмістилищ досліджено достатньо детально. Варто зазначити, що диференціація клітин секреторного епітелію починається на самих ранніх стадіях розвитку листкових метамерів і квіток (рис. 2.16). Квітки рослин вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* правильні актиноморфні, п'ятичленні, протоандричні. Чашечка п'ятичленна зрослолиста. Віночок зрослопелюстковий, частки пелюстків майже повністю розсічені. Гінецей лізикарпний з п'яти плодолистків.

У рослин роду *Lysimachia* найважливішими активними компонентами є фенольні сполуки і насамперед флавоноїди [20]. У тканинах вегетативних і генеративних органів рослин роду *Lysimachia* ідентифіковано широкий спектр флавоноїдів. Для цього роду характерні глікозиди кемпферолу, кверцетину та

мірицитину. Ці речовини були виділені з тканин *Lysimachia vulgaris*, *Lysimachia punctata*, *Lysimachia nummularia* [29], *Lysimachia muuritianu*, *Lysimachia vulgaris var. duvurica*, *Lysimachia congestiflora*.

Дослідження останніх років показали, що в тканинах рослин синтезується понад 12 флавонолглюкозидів. Серед них ідентифіковано трифлолін, ізокверцитрин, мірицитрин, сиригетин 3-О-галактозид, кампферол 3-О-рамонозил (1-2) галактозид, кверцетин 3-О-неогесперидіоїд та рутин. Виявлено також кемпферол 3-О-(2,6-ди-рамнозилгалактозид) і кверцетин 3-О-(2,6-ди-рамнозилгалактозид). У рослинах *Lysimachia capillipes* Hemsl. відкрито нові три- і тетрасахаридні флавонолові глюкозиди – капіліпозид I і II [34].

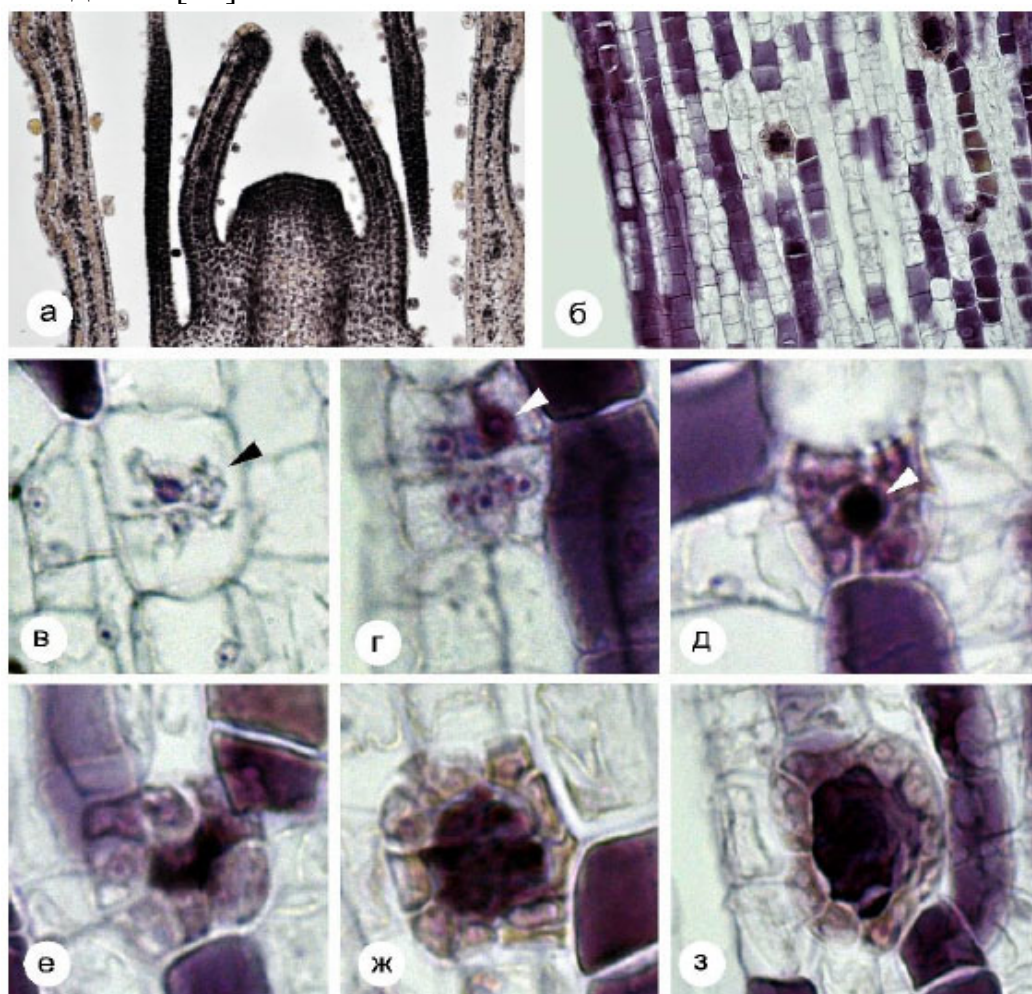


Рисунок 2.16. Структурна та біохімічна гетерогенність клітин кори і етапи формування вмістилищ у стеблах *Lysimachia nummularia*: а – апікальна меристема пагона; б – біохімічна гетерогенність клітин кори стебла; в–з – стадії формування вмістилищ у стеблах (пояснення в тексті)

У тканинах вегетативних органів виявлено ембелін [28], який показав високу антибактеріальну активність щодо *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* та *Pseudomonas aeruginosa*; помірну проти *Salmonella typhi*, *Salmonella boydii* та *Proteus mirabilis* [18].



Вегетативні органи рослин *Lysimachia nummularia* вже на самих ранніх стадіях онтогенезу характеризуються накопиченням в епідермісі та в шарі клітин під ним значної кількості вторинних метаболітів. Більшість з них заповнюють протопласт настільки густо, що в процесі мікроскопіювання не проглядаються ядра та вакуолі (рис. 2.15). Біохімічний аналіз показав, що флоральні ліпіди рослин роду *Lysimachia* мають багатоконпонентний склад. Окрім олій і нектару у генеративних органах синтезується складний комплекс вторинних метаболітів: фенольних сполук, флавоноїдів конденсованих танінів, терпеноїдів і тритерпенових сапонінів [24].

За гістохімічними реакціями переважна більшість цих речовин – фенольні сполуки. Вони виявляють здатність поглинати ультрафіолетове випромінювання, мають помірні фунгіо– і бактеріостатичні властивості. Окрім того, у стеблах вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* знаходиться доволі розвинута система секреторних вмістилищ, які також заповнені густим секретом темно-помаранчевого забарвлення. Тривалий час обговорювалась будова секреторних вмістилищ. В останніх публікаціях щодо їхнього типу висловлювались досить суперечливі думки. За нашими спостереженнями розвитку вмістилищ суперечливі думки пов'язані з тим, що в стеблах *Lysimachia nummularia* формуються секреторні структури зовсім іншого походження. Ці структури мають два типи секреторних клітин: зовнішню – із секреторного епітелію і внутрішню – із групи клітин, що активно синтезують фенольні сполуки (рис. 2.17, а–в).

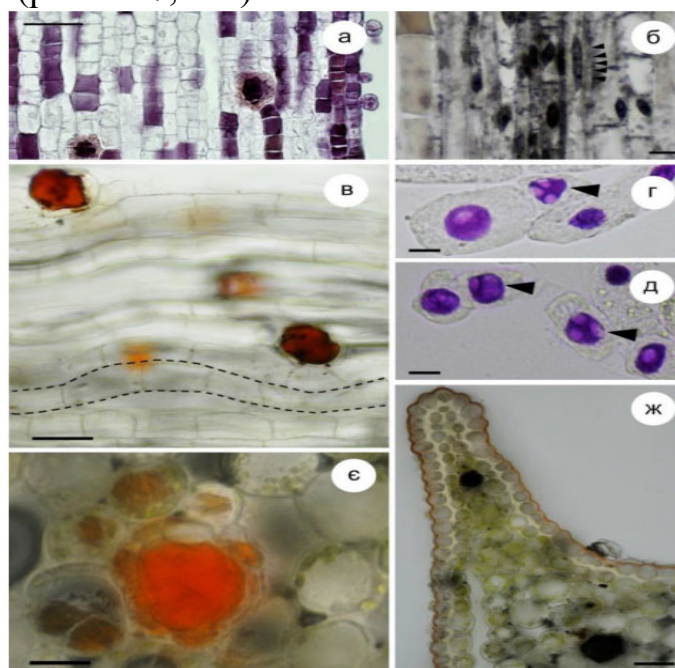


Рисунок 2.17. Секреторна система та біологічна активність метаболітів стебел *Lysimachia nummularia*; а,в,е,ж – генезис і просторове розташування секреторних вмістилищ; б – утворення мультіядерцевих клітин у тканинах стебла; г,д – утворення мультіядерцевих клітин у меристемі коренів цибулі під впливом метанольних екстрактів листків *Lysimachia nummularia*; лінійка (мкм): а – 200; б – 20; в – 70; г, д – 10; е – 40; ж – 100



Гістохімічно внутрішні і зовнішні клітини відрізняються, що свідчить про їх функціональну різноплановість. Цілком можливо, що саме ці клітини або їх залишки Гутенберг розглядав як повторне утворення клітинних стінок епітелієм. Згодом, коли внутрішні секреторні клітини повністю заповнюються полімеризованими фенольними сполуками, вони стають складними для мікроскопічного дослідження і розглядаються як гомогенна полімеризована маса. Також, ми не заперечуємо, що в стеблах можуть утворюватися справжні схізогенні вмістилища (рис. 2.17, є).

Функція секреторних вмістилищ, перш за все, пов'язана з біохімічним складом секрету. Так, у *Lysimachia nummularia* за реакцією на водний розчин аміаку, що призводить до посилення помаранчевого забарвлення, на розчин хлориду заліза (III) секрет представлений фенольними сполуками, основою яких є бензохінон. Оскільки відомо, що в листках і стеблах *Lysimachia nummularia* основним бензохіноном є ембелін та його метильовані похідні [24], і спираючись на дані гістохімічного аналізу, цілком можливо, що секреторні клітини активно їх синтезують.

Як повідомлялось вище, ембелін доволі активна сполука з вираженими бактерицидними й антиоксидантними властивостями, яка здатна брати участь в окисно-відновних процесах. Зазвичай, система секреторних вмістилищ розміщена в коровій частині стебла, а також у його крилоподібних виростах. Накопичення й активна дифузія алкилбензохінонів у прилеглі тканини може істотно впливати на процеси видовження клітин і регулювати просторове положення листків і стебла. Цей механізм регуляції просторової орієнтації стебла і листків є екологічно важливим, оскільки дозволяє оптимізувати режим освітленості рослини в процесі росту і розвитку, а також під впливом зовнішніх чинників. Показано, що клітини паренхіми, які безпосередньо розташовані біля вмістилищ, мають нерівномірно розтягнуті клітинні стінки (рис. 2.17, в – пунктирна лінія). Внаслідок чого відбувається деформація клітин, яка під дією внутрішніх пружних сил здатна скручувати стебло і черешки листків, у крилоподібних виростах яких також утворюються секторні канали (рис. 2.17, ж).

Біологічно активні речовини листків і стебла *Lysimachia nummularia* викликають формування в клітинах мультіядерцевих ядер. Такий факт було виявлено під час дослідження незрілих тканин стебла ювенільних рослин. Метанольні екстракти молодих листків підтвердили здатність ендометаболітів індукувати утворення мультіядерцевих ядер у тест-культури *Allium cepa* L. (рис. 2.17, г, д). Просторове положення рослин є ключовою ознакою стратегії їхнього пристосування до умов зростання. Форма рослин тісно зв'язана з фізіологічними процесами та морфо-анатомічною будовою тканин і органів. Структурно-функціональна пластичність рослин, розмах норми реакції в межах нормальної мінливості є важливим показником потенціалу їх фізіологічної адаптації. Важливою складовою регуляторних функцій рослин є

вторинні метаболіти, які підтримують гомеостаз і забезпечують міжвидові взаємодії, зокрема з комахами–запилювачами та шкідниками.

Розглянемо зв'язок між морфо–анатомічною будовою пагонів рослин роду *Lysimachia* і специфікою будови їхніх внутрішніх секреторних систем, що тісно пов'язані з синтезом фізіологічно активних вторинних метаболітів.

У рослин вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* пагін сланкий до 30 см, з міжвузлями завдовжки 8–10 см. Перші листки мезофільні, тонкі, м'якої консистенції. Воскове покриття не виражене. Нижні листки з часом відмирають. Важливою видоспецифічною ознакою є форма стебла. Стебло від черешків сплюснене і має низхідні крилоподібні вирости, які знаходяться в площині розташування черешків (рис. 2.17, ж).

У зв'язку з супротивним розташуванням листків черешки скручуються і виносять листову пластинку в оптимальну площину для забезпечення рівномірного освітлення. Зовні це надає стеблу виду структури, складеної з окремих частин. Рухливість пагона є функціональною складовою загальної системи фото– і, можливо, хемотаксису рослин, які сприймають зовнішні стимули, орієнтуються в просторі й адаптуються до умов зростання.

Оскільки фенольні сполуки здатні активно взаємодіяти з білками і фітогормонами, беззаперечно, що їхня роль як головних компонентів секреторних систем рослин роду *Lysimachia* полягає в регуляції ростових процесів (перш за все розтягуванням) через активацію/деактивацію фітогормонів ауксинового типу. На тканинному рівні про це свідчить просторова специфіка закладки секреторних каналів. Наприклад, у *Lysimachia nummularia* їх може бути декілька і вони зосереджені в термінальних і крилоподібних виростах, що разом із черешками є найрухомішою частиною стебла. Але для доведення цієї гіпотези потрібне проведення додаткових досліджень.

В умовах Київського Полісся більшість рослин *Lysimachia nummularia* має низький генеративний потенціал і тому популяції цього сільванта часто представлені вегетативними клонами. Типовою для вербозілля є гейтоногамія, коли запилення відбувається між квітками генетично однакових рослин. Перехресне запилення забезпечують бджоли, яких рослини приваблюють за допомогою специфічних атрактантів. Їх синтез відбувається в спеціальних клітинах членисто–головчастих трихом секреторного типу, що формуються на тичинкових нитках, а також на адаксіальній й абаксіальній поверхнях пелюсток і чашолистків.

Кількість трихом на одиницю площі є мінливою ознакою, яка залежить від умов місцезростання рослин. В елементах квітки найбільша кількість трихом спостерігається на тичинкових нитках. Головчасті трихоми мають досить складну будову. Вони утворюються з епідермальних клітин. Після периклінального поділу базальна клітина ділиться ще раз або двічі, від чого формується дво– три–, іноді – чотириклітинна ніжка. Верхня клітина ділиться антиклінально й утворює багатоклітинну головку трихома. Клітини ніжок

трихом біля основи тичинкових ниток досить видовжені, а базальні й середні клітини вкриті товстим шаром кутикули.

Поліфункціональність трихом у рослин *Lysimachia nummularia* ґрунтується на біохімічній та анатомічній гетерогенності клітин і секреторних структур, які є функціональною складовою екологічної пластичності виду. Така специфіка пов'язана із синтезом і локалізацією вторинних метаболітів, а також вільних жирних кислот і полісахаридів. Окрім летких речовин і олій, у квітках рослин вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* синтезується і накопичується значна кількість фенольних сполук. За нашими даними, збільшення вмісту фенолів (кон'югатів оксикоричних кислот, флавоноїдів і конденсованих танінів), тритерпенових сапонінів та терпеноїдів у тканинах листків, стебел і квіток відбувається вже на початкових стадіях їхнього розвитку. Гістохімічні реакції дозволили виявити, що здебільшого вони локалізовані в цитоплазмі клітин верхнього і нижнього епідермісу. Перші клітини, що заповнюються поліфенольними сполуками (ідіобласти), виявляються в примордіях листків і в клітинах апікальної меристеми на відстані 180–250 мкм від точки росту. У стеблах ювенільних пагонів і квітконіжок групи ідіобластів локалізуються серед клітин паренхіми вздовж провідних пучків. Варто зазначити, що в секреторних клітинах виявлено високий вміст білків, які майже відсутні в клітинах–ніжках. На особливу увагу заслуговує вміст і розподіл полісахаридів у структурах тканин генеративних органів, серед яких переважна частка належить пектинам.

Відомо, що в онтогенезі рослин відбуваються зміни у вмісті пектинових речовин, відношенні їх розчинних форм до нерозчинних протопектинів, які локалізовані в різних частинах рослинних клітин і виконують різні функції. Протопектин входить до складу клітинних оболонок і серединних пластинок. Розчинні пектини містяться переважно в міжклітинниках і вакуолях. Водночас загальний вміст пектинів, їх співвідношення та локалізація суттєво залежить від віку рослини, функцій тканин, умов росту та розвитку рослин. Залежно від ступеня етерифікації, молекулярної масти, вмісту ацетильних груп різні структурні одиниці пектину мають різну біохімічну активність. Ураховуючи, що пектинові речовини мають властивості поверхнево–активних сполук, їх присутність у вакуолярному соці і протопласті клітин створює умови для відносно рівномірного розподілу і транспорту середньо- і низькополярних сполук, до яких відносяться прості феноли, аглікони флавоноїдів, терпеноїди та інші речовини вторинного метаболізму. Молекули пектинів у розчинах утворюють клубки ланцюгів, що знаходяться на різних відстанях одна від одної. У разі наближення вони утворюють зону контакту. Елементарна комірка зони контакту в низькоетерифікованих пектинах утворює чотири залишки полігалактуронової кислоти, що здатні активно взаємодіяти з іонами металів. Між атомами металів і киснем піранозних циклів утворюються водневі зв'язки, а з карбоксильними групами – іонні. Такі металополісахаридні комплекси є важливою складовою системи регуляції окисно–відновних процесів у клітинах.

Зони контакту високоетирифікованих пектинів мають іншу структуру. Вони утворюються довгими ланцюгами молекул, що стабілізуються за рахунок водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій. Останні виникають унаслідок взаємодії молекул води з метоксильними групами пектину, які об'єднуються в групи і зменшують площу поверхневого контакту з водою. Це створює специфічні умови для просторового розташування, розчинності і реакційної здатності молекул з високою антиоксидантною активністю, зокрема флавоноїдів і катехінів. Саме останні у процесі окиснювання поліконденсуються з утворенням малорозчинних фенольних полімерів – флобафенів. Нами визначено, що більшість нерозчинних у спиртах конденсованих поліфенольних сполук, які в значних кількостях містяться в клітинах паренхіми квітколожа, інтегументального тапетума та епідерміса пелюсток, оточені пектинами і зв'язаними з ними іншими полісахаридами (рис. 2.18).

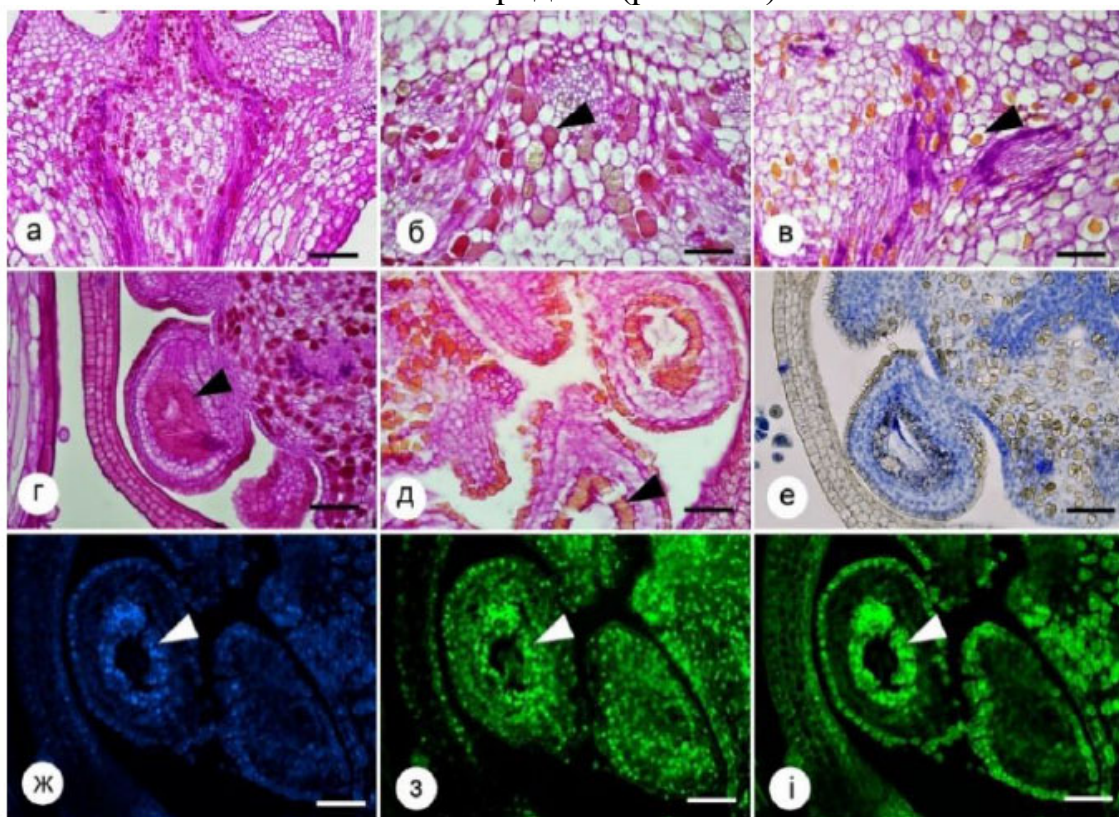


Рисунок 2.18. Локалізація полісахаридів і білків у клітинах та тканинах генеративних органів *Lysimachia nummularia*: а–д – локалізація полісахаридів та поліфенолів у стінках зав'язі та тканинах насінних зачатків до (а, б, г) і після (в, д) ферментативного гідролізу пектинових речовин; е – білок (зabarвлено синім) у тканинах насінневого зачатка і плаценти; ж–і – автофлуоресценція тканин насінневих зачатків; реакція ШЙК (Шифф–Йодна кислота) на виявлення полісахаридів після обробки тканинами геміцелюлози та ксиланази (стрілка вказує на ідіобласти); лінійка: а,г,е – 200 μm; б,в,д – 100 μm; ж–і – 75 μm

Після гідролізу пектиназою, клітини тканин зав'язі, насінневих зачатків і тичинок, що містили поліфенольні сполуки, більше не виявляли позитивної реакції на полісахариди (рис. 2.19).

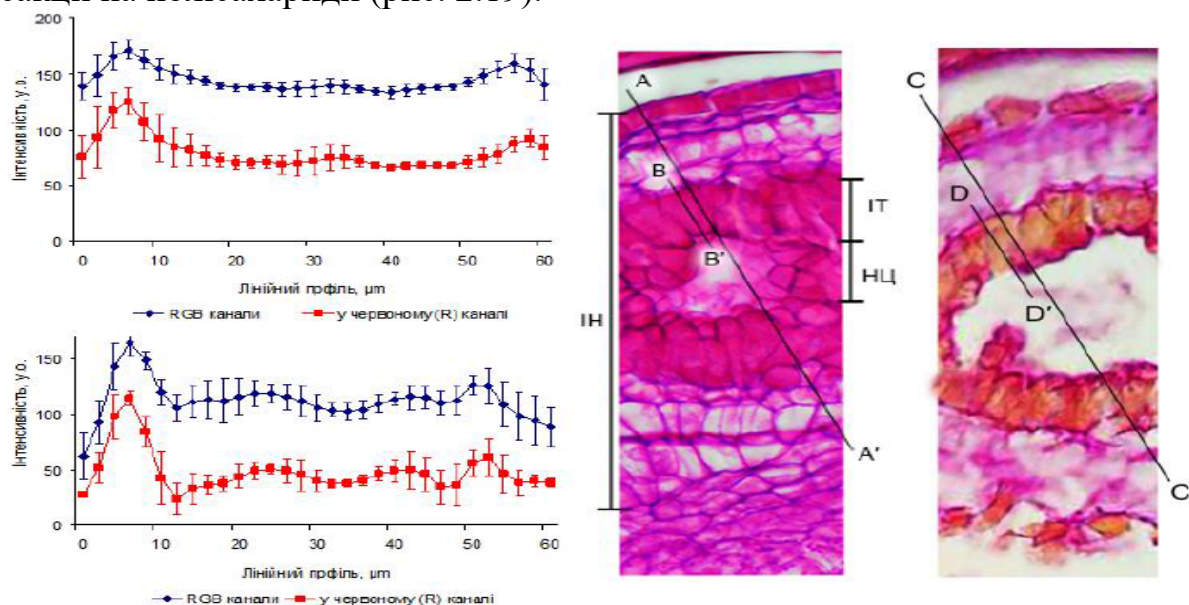


Рисунок 2.19. Лінійні профілі інтенсивності гістохімічної реакції на полісахариди тканин насінневих зачатків *Lysimachia nummularia* до (профіль А–А') і після (профіль С–С') ферментації тканин пектиназою

Інтегументальний тапетум унітунікатних насінневих зачатків, виконує функцію провідної і секреторної тканини. Його клітини беруть участь у регуляції росту зародків за рахунок синтезу і транспорту гормонів та інших важливих метаболітів. Відзначається висока компартментизація клітин інтегументального тапетума (рис. 2.18, е) з формуванням крупних вакуолей, значним вмістом білка, фенолів і пектинових речовин. Полісахариди становлять значну частину в загальному компонентному складі тапетума. За допомогою побудови профілів інтенсивності гістохімічних реакцій вдалося визначити, що пектини зосереджені переважно в протопласті та вакуолях клітин (рис. 2.19). Достатньо інформативним виявилось також дослідження розподілу полісахаридів за умов диференціального вивчення цифрового зображення за синім (В) і червоним (R) каналами. У головчастих трихомах *Lysimachia nummularia* нами також виявлено значні відкладення полісахаридів. У протопластах клітин-ніжок визначено пектини і геміцелюлози. Втім, існує певна просторова нерівномірність їхнього розподілу в клітинах трихом (рис. 2.20).



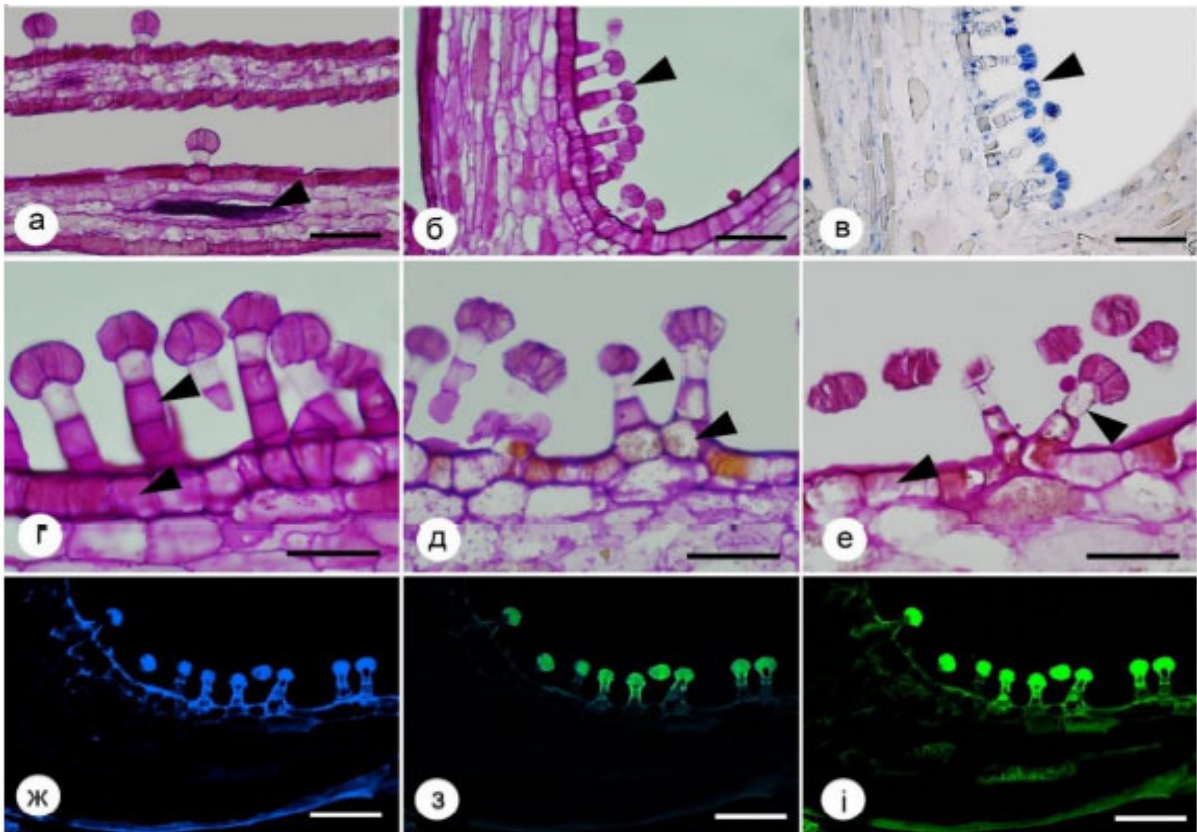


Рисунок 2.20. Локалізація білків і полісахаридів у вмістилищах і трихомах генеративних органів *Lysimachia nummularia*: а – полісахариди у секреторних вмістилищах оцвітини; б – розподіл полісахаридів у клітинах секреторних трихом; в – локалізація білка в секреторних клітинах; г – накопичення полісахаридів в епідермісі, середніх та базальних клітинах ніжок трихом; д – реакція на полісахариди після ферментативного гідролізу пектинових речовин; е – реакція на полісахариди після ферментативного гідролізу тканин ксиланазою та геміцелюлазою; (реакція на полісахариди – ШЙК); лінійка: а–в, ж–і – 100  $\mu\text{m}$ ; г–е – 50  $\mu\text{m}$

У більшості ідіобластів поліфенольні сполуки оточені полісахаридними капсулами на основі пектинів, ксиланів і геміцелюлоз, які зменшують ризики автоінтоксикації клітин через негативний вплив продуктів окиснювання фенолів. Специфічне відкладання і розподіл полісахаридів у клітинних стінках і протопластах ідіобластів, клітин епідермісу та головчастих трихом за наявності відповідних гідролаз створює передумови для їхнього мобільного перетворення на оліго-, ди- і моносахариди, що забезпечує тканини необхідними для росту і розвитку вуглеводами.

Тривалий час у питанні систематичного положення рослин роду *Lysimachia* не було чіткого визначення. На підставі географії ареалів, морфологічних ознак, будови квітки більшість дослідників відносила представників роду *Lysimachia* до родини *Primulaceae*. У роботах Фогеля, який ретельно досліджував анатомію квіток і хімічний склад ексудатів понад 100 видів *Lysimachia*, було зроблено припущення щодо монофілічності рослин, квітки яких синтезують олії, водночас нектарсинтезуючі види рослин

запропоновано розподілити на різні групи. Підґрунтям для цього було те, що, не зважаючи на подібність морфологічної будови залозистих трихом, у генеративних органах рослин роду *Lysimachia* формуються структури двох типів: одні – синтезують олії, інші – виробляють нектар. Квітки усіх без винятку рослин, що здатні до синтезу олії, виявляють жовте забарвлення, мають відкритий віночок і базально зрощені тичинкові нитки. Згодом гіпотезу Фогеля не підтвердили результати інших дослідників, оскільки не всі види, що синтезують олію у квітках виявляли спільні еволюційні корені. Застосування молекулярно-генетичних методів аналізу суттєво змінило сучасний погляд на систему порядку *Ericales*.

#### 2.4. Фітохімічний склад та біологічна активність індивідуальних сполук вегетативних і генеративних органів рослин вербозілля лучного (*Lysimachia nummularia*)

Для з'ясування специфіки складу активних метаболітів в екстрактах вербозілля було проведено біохімічне профілювання. Фітохімічні дослідження показали, що в спиртових екстрактах листків рослин *Lysimachia nummularia* містяться 3 основних фенольних (254 нм) сполуки. За хвили завдовжки 205 нм кількість виявлених речовин збільшилась до 7 (рис. 2.21, а–б). За даними у листках вербозілля лучного *Lysimachia nummularia* міститься глікозид мирицетину – мирицетрин, який є основним флавонолом вегетативних і генеративних органів.

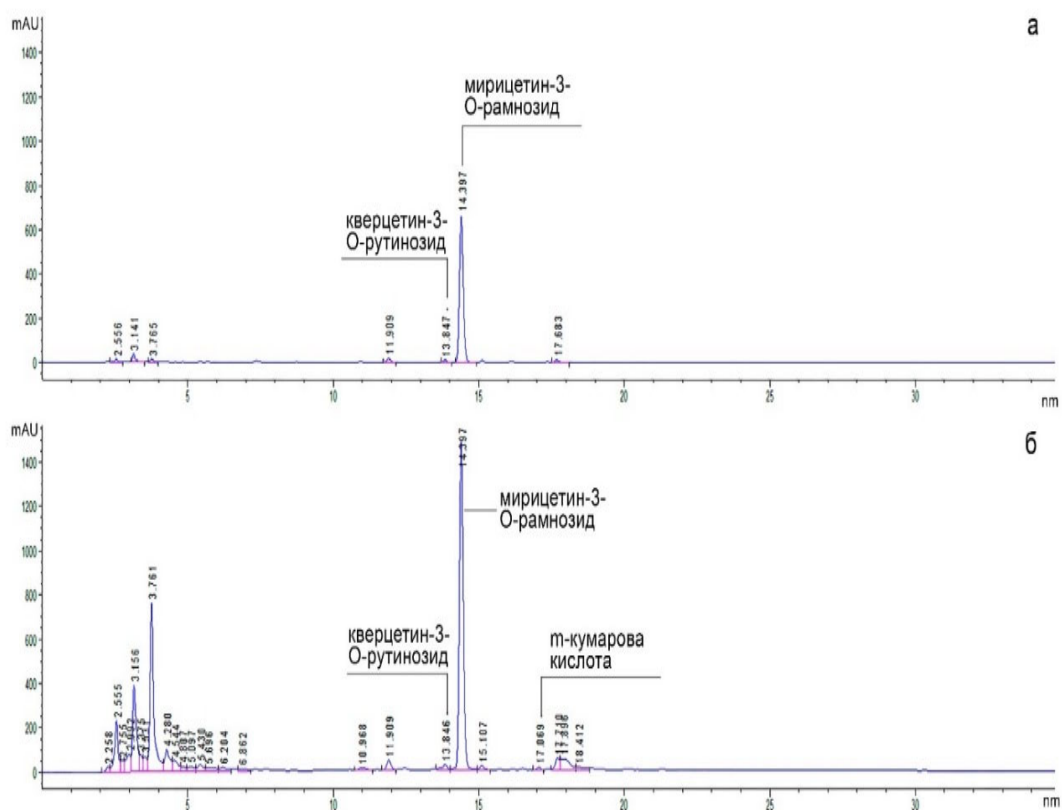


Рисунок 2.21. Хроматографічний профіль метанольних екстрактів листків *Lysimachia nummularia*; піки індивідуальних сполук: а – за  $\lambda = 254$  нм; б – за  $\lambda = 205$



За отриманими нами даними, якісний склад середньополярних речовин в екстрактах листків і квіток майже подібні. Незначні відмінності в профілях виявлено лише за мінорними піками. Основний із них ( $t = 14,410$  хв) має спектр, який характерний для мирицетину–3–О–рамнозиду (мирицетрин) (рис. 2.22).

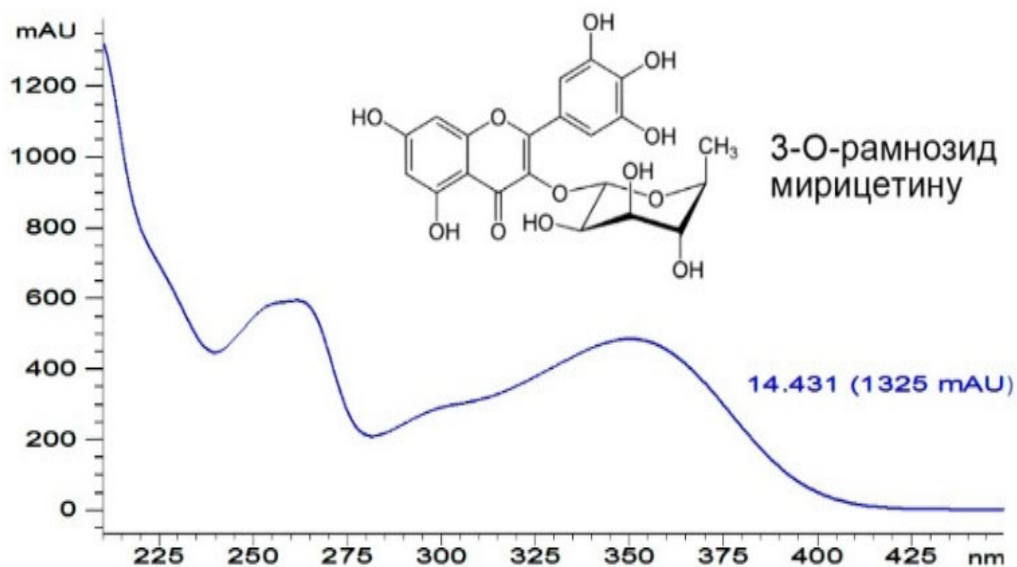


Рисунок 2. 22. Електронний спектр мирицетрину, який міститься у листках і квітках *Lysimachia nummularia*

Окрім мирицетину, також були визначені флавоноїди, агліконами яких є кемпферол і кверцетин. Саме їхні глікозиди виявлені в екстрактах листків і квіток за характерним УФ–спектрами. Варто зазначити, що якісний склад індивідуальних флавонолів та інших фенольних речовин у квітках також представлений глікозидами мирицетину, кемпферолу і кверцетину, переважно кверцетин–3–О–рутинозидом. У піків із часом утримання в інтервалі від 11,926 до 25,846 хв зосереджені індивідуальні сполуки, що мали подібні спектри поглинання, які відносять їх до класу флавонолів.

За результатами хроматографічного профілювання було складено таблицю, у якій систематизовано основні характеристики та наявність в органах визначених нами сполук (табл. 2.1).

Виявлені нами оптично активні сполуки представлені переважно фенолами (катехіни, флавоноїди, оксикоричні і оксибензойні кислоти, конденсовані таніни, стильбеноїди). Більшість отриманих УФ–спектрів відноситься до групи флавоноїдів (глікозидів кверцетину і кемпферолу).

Речовина з часом утримання 30,313 хв з максимумом поглинання 287 нм і плечем 330–340 нм визначена нами як тритерпеновий сапонін, агліконом якого для рослин роду *Lysimachia* зазвичай є олеонолова кислота.

Таблиця 2.1

Порівняльний аналіз вмісту вторинних метаболітів у листках і квітках  
*Lysimachia nummularia*

Час утримання, хв	Клас сполуки	УФ $\lambda_{\max}$ , нм	Листки	Квітки
7,368	не визначено	239	+	-
7,821	4-гідроксибензойна кислота	253	-	+
8,751	не визначено	261, 311, Sh*	+	+
9,069	4-гідрокси-3-метоксибензойна кислота (ванілінова кислота)	216, 257, 291	-	+
10,944	флавонол	262, 356	+	+
11,909	флавонол	258, 356	+	+
13,847	кверцетин-3-О-рутинозид (рутин)	255, 355	+	+
14,186	p-кумарова кислота	262, 352	-	+
14,397	мирицетин-3-О-рамнозид (мирицетрин)	256, 355	+	+
15,111	флавонол	256, 356	+	+
16,124	не визначено	235, 323, Sh	+	-
16,153	флавонол	266, 348	-	+
16,668	не визначено	287	-	+
17,350	не визначено	347	+	-
17,683	флавонол	256, 350	+	+
21,010	флавонол	267, 350	-	+
25,466	флавонол	267, 350	-	+
25,846	флавонол	255, 369	-	+
27,232	стильбеноїд	293	-	+
30,313	тритерпен	287, Sh	-	+

\* Примітка: Sh – плече на спектрограмі

Високий вміст флавонолів, катехінів, а також стильбенів визначає високий антиоксидантний потенціал тканин вербозілля, що дозволяє рослинам переносити дію стресових чинників (табл. 2.2). Висока антиоксидантна активність, поряд із вітаміном С, обумовлена високим вмістом у тканинах мирицетрину. Значну кількість флавонолових антиоксидантів виявлено також і у пилку *Lysimachia nummularia*, що може пояснити ефект стимуляції

проростання пилку *Impatiens parviflora* DC., який спостерігала О.А. Ігнатюк із колегами під час одночасного культивування пилку двох видів рослин.

Таблиця 2.2

Загальний вміст фенольних сполук і антиоксидантів у водних екстрактах листків та квітках *Lysimachia nummularia*

Субстрат	Ph, мг/г	F, мг/г	Ph/F	K, мг/г	АО, мМ–екв
Листки	46,2 ±3,31	10,8 ±0,64	4,3 ±0,31	33,9 ±1,89	24,0 ±1,50
Квітки	43,9 ±2,10	9,5 ±0,57	4,6 ±0,20	31,8 ±1,24	24,3 ±1,26

Примітка: Ph – феноли, F – флавоноїди; K – катехіни; АО – антиоксиданти (мМоль–екв Trolox)

Вважається, що вторинні метаболіти листків і квіток здатні пригнічувати ріст патогенних бактерій і грибів. У традиційній китайській медицині спиртові екстракти листків *Lysimachia* широко використовують при лікуванні ревматизму, гінгівіту, стоматиту, пародонтозу і гнійних захворювань шкіри у зв'язку з їхніми вираженими антибіотичними та протизапальними властивостями. Для оцінювання бактерицидної дії екстрактів листків і квіток було проведено серію експериментів. У ролі тестових об'єктів було використано чисті культури грам–позитивних і грам–негативних бактерій (5 видів) і грибів (3 види). Лабораторні дослідження показали, що метанольні екстракти *Lysimachia nummularia* виявляють вибіркову дію на рослини, мікроорганізми і гриби (табл. 2.3–2.5).

Біологічну активність метаболітів в екстрактах листків і бутонів квіток *Lysimachia nummularia* вивчали методом біотесту (культура – редис сорту Червоний з білим кінчиком). Експеримент показав, що на початку проростання насіння метаболіти листків пригнічують фізіологічні процеси. За 20–25 год явище пригнічення тест–культури нівелюється і показник схожості збільшується на 10–12 %. Вторинні метаболіти, що містяться у квітках на стадії бутонів, навпаки, виявляли рістстимулювальну активність, що також пов'язано з наявністю у квітках високої концентрації фітогормонів.

Графічний вираз динаміки проростання насіння редису має вигляд асиметричної логістичної кривої, яка описується функцією Гомпертца:

$$T = A^{-e^{-\left(\frac{t-t_0}{v}\right)}}$$

де  $T$  – схожість насіння (%),  $A$  – верхня горизонтальна асимптота,  $t$  – час,  $t_0$  – час, у який швидкість проростання ( $a$ ) насіння тест–культури є максимальною;  $v$  – показник, обернено пов'язаний зі швидкістю процесу, який описує ця функція

Точність апроксимації динаміки проростання насіння ( $R^2 \sim 0,991–0,997$ ) є достатньою для використання обраної нами логістичної функції як базової моделі (рис. 2.23).

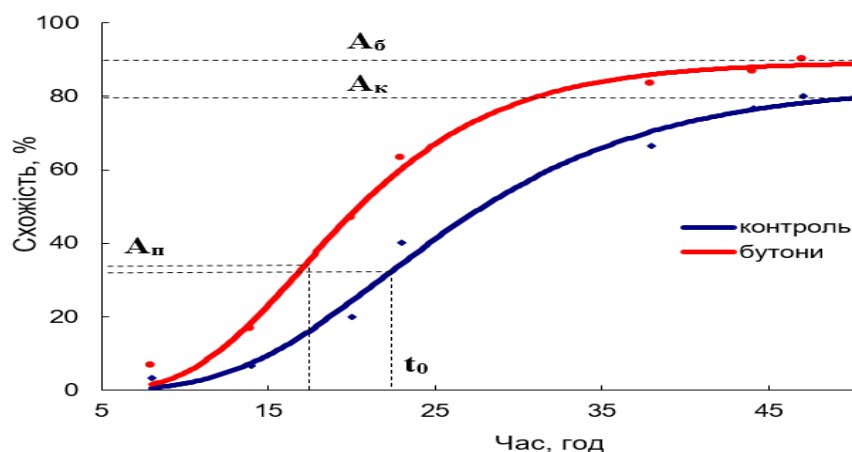


Рисунок 2.23. Математична модель впливу метаболітів генеративних органів *Lysimachia nummularia* на проростання насіння тест-культури (редис сорту Червоний з білим кінчиком)

За вище означеною функцією параметр  $A$  є верхньою горизонтальною асимптотою, яка відповідає рівню насиченості логісти. Її біологічний зміст пов'язаний з абсолютною схожістю насіння тест-культури. Факт відмінності параметрів горизонтальної асимптоти за умов додавання екстрактів листків і бутонів вербозілля (розведення – 1:70) вказує на потенційну здатність біохімічних складових екстрактів стимулювати процеси проростання, що може бути використано для підвищення схожості насіння лісових культур, а також для укорінення живців.

Показник  $t_0$  – абсциса точки перегину функції, положення якої для даної математичної моделі свідчить про те, що між стадіями швидкого і повільного проростання насіння виявляється чітка асиметрія.

Показник  $v$  у цій функції є параметром зворотнім швидкості фізіологічного процесу. Відтак очевидно, що параметр  $1/v$  характеризує фізіологічну активність, яка є достатньо інформативною для визначення сили впливу біологічно активних сполук на насіння тест-культури (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Показники логістичної функції і впливу метаболітів *Lysimachia nummularia* на проростання насіння тест-культури (редис сорт Червоний з білим кінчиком)

Варіанти	Показники функції *					
	A	$A_p$	v	$a(1/v)$	$t_0$	$R^2$
Контроль (вода)	82,9349	30,510	8,9222	0,11208	21,8277	0,991
Екстракт листків	96,4502	35,482	9,7254	0,10282	24,8699	0,994
Екстракт бутонів	89,9687	33,098	6,6162	0,15114	16,9607	0,997

\* Пояснення у тексті

За нашими даними, екстракти листків майже не впливали (іноді дещо знижували) на швидкість проростання насіння тест-культури, а екстракти бутонів, навпаки, – у 1,34 рази прискорювали цей процес, що підтверджує перспективність проведення досліджень у цьому напрямку.

Таблиця 2.4

Антибіотична активність метанольних екстрактів листків і квіток

*Lysimachia nummularia*

Культура мікроорганізму	За грамом	Зразки	Діаметр пригнічення росту культури, мм	Чутливість
<i>Micrococcus luteus</i>	+	Л	6,0	м/ч
		К	6,0	м/ч
<i>Brevibacterium</i>	+	Л	0,0	н/ч
		К	0,0	н/ч
<i>Staphilococcus aureus</i>	+	Л	7,0	м/ч
		К	7,0	м/ч
<i>Escherichia coli</i>	–	Л	0,0	н/ч
		К	7,0	м/ч
<i>Bacillus subtilis</i>	+	Л	5,0	м/ч
		К	5,0	м/ч

Примітка: л – екстракт із листків; к – екстракт із квіток; н/ч – нечутливі, м/ч – малочутливі

Екстракти квіток стосовно мікроорганізмів і грибів були значно активніші за листки. Однак виявлені нами властивості не достатні для того, щоб розглядати їх в ролі ефективних засобів із бактерицидною і фунгіцидною діями.

Тестування водних екстрактів листків і квіток також не виявили антибіотичних властивостей. У ході зберігання нестерильних водних екстрактів листків за температури 25 °С протягом 14 днів на поверхні рідини було помічено активний ріст і спороношення мікроміцету роду *Mucor*.

У водних екстрактах квіток спостерігалися розвинення пліснявих грибів роду *Penicillium*. Отже, полярні і середньополярні сполуки листків і квіток *Lysimachia nummularia* є високоактивними антиоксидантами зі слабкою антибіотичною дією, що зокрема виявлена на колоніях *Staphilococcus aureus*.

Дослідження антибіотичної дії індивідуальних компонентів (терпеноїдів, стеринів, кетонів тощо) рослинної сировини *Lysimachia nummularia* надалі варто проводити лише на малополярних сполуках, а антиоксидантні властивості – на спиртових екстрактах.

Антифунгальна активність метанольних екстрактів листків і квіток  
*Lysimachia nummularia*

Культура гриба	Патогенність	Зразки	Діаметр пригнічення росту культури, мм	Чутливість
<i>Candida albicans</i>	+	л	ст	н/ч
		к	7,0	м/ч
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	л	0,0	н/ч
		к	6,0	м/ч
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	л	0,0	н/ч
		к	0,0	н/ч

Примітка: умовні позначки див. табл. 2; ст – стимуляція

Оскільки пектинові речовини є природним полімером, що структурує і захищає метаболіти секреторних тканин генеративних органів *Lysimachia nummularia* від окиснювання, нами було проведено дослідження ефективності використання яблучного пектину для адсорбції і зберігання біологічно активної речовини генеративних органів цінної лікарської рослини.

Для цього 5 г висушених квіток *Lysimachia nummularia* розтирали і просіювали через сито 1 мкм. Рослинний матеріал екстрагували в 50 мл метилового спирту. Фільтрували через фільтрувальний папір синя стрічка. До екстракту за безперервним помішуванням поступово додавали яблучний пектин до утворення однорідної густої розсипчастої маси. Отриману субстанцію просушували на фільтрувальному папері і далі зберігали у скляному посуді (рис. 2.24).

Біологічну активність отриманої субстанції перевіряли за здатністю пригнічувати розвиток ґрунтових мікроорганізмів і грибів. Для дослідження готували 2 % розчин пектину. Пектин із адсорбованими на ньому метаболітами квіток *Lysimachia nummularia* розчиняли в дистильованій воді за 25 °С з постійним перемішуванням на магнітній мішалці. До готового розчину в об'ємному співвідношенні 1:1 додавали водний екстракт ґрунту, який готували за стандартним методом проведення мікробіологічних досліджень.



Рисунок 2.24. Адсорбовані на пектині метаболіти квіток *Lysimachia nummularia* і готові препарати для оцінювання їхньої біологічної активності щодо ґрунтових мікроорганізмів і грибів (фарбування: сафранін–водний синій)

На предметне скло наносили 50 мкл отриманого 1,0 % розчину яблучного пектину з ґрунтовою витяжкою. Рідину рівномірно розподіляли по поверхні. Зразки переносили у стерильні чашки Петрі, на дно яких розкладали вологий стерильний фільтрувальний папір. Інкубацію проводили у вологій камері протягом 24 год. Контрольні зразки виготовляли з розчину чистого пектину, до якого додавали ґрунтову витяжку. Оцінювання бактеріостатичної і фунгіостатичної дії проводили за результатами мікроскопіювання за кількістю спор, бактеріальних клітин і фрагментів міцелію на одиницю площі (n = 10).

Результати проведених досліджень показали, що під дією екстрактів у розчині яблучного пектину значно зменшується кількість грам–негативних і грам–позитивних бактерій (рис. 2.25).

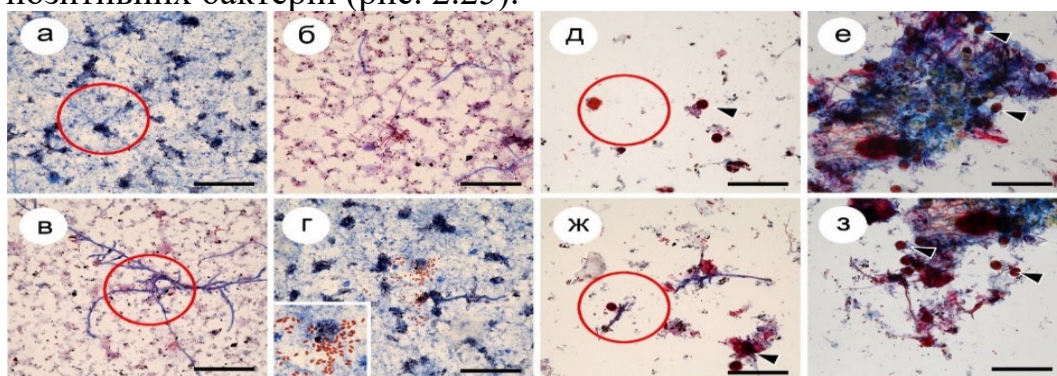


Рисунок 2.25. Специфіка впливу біологічно активних метаболітів екстрактів квіток *Lysimachia nummularia* на ґрунтові мікроорганізми і гриби на пектиновому субстраті: а–г – контроль; д–з – за додавання екстракту; стрілками показано мікроспори рослини; лінійка – 100 μm

Дослідження підтвердили високу біологічну активність внутрішньоклітинних метаболітів *Lysimachia nummularia*. Також було визначено, що перенесення метанольних екстрактів квіток на пектиновий сорбент є досить перспективним способом зберігання фенолів, терпенів і насичених та ненасичених жирних кислот, що може мати практичне значення.

Доведено, що секреторні клітини у листках *Aesculus hippocastanum* формуються з клітин палисадної паренхіми і не мають зв'язку з механізмами стійкості рослини проти каштанової мінуючої молі.

Будова і функції внутрішньої секреторної системи пагонів *Humulus lupulus* і *Lysimachia nummularia* синхронізовані з вторинним метаболізмом, який залежить від фази розвитку рослини.

Показано, що секреторні тканини вегетативних і генеративних органів *Humulus lupulus* і *Lysimachia nummularia* активно накопичують фенольні сполуки, стабілізовані полісахаридами (пектинові речовини та геміцелюлози), з регуляторною й антимікробною активністю. З'ясовано, що секреторні канали стебел трав'яних рослин *Humulus lupulus* і *Lysimachia nummularia* формуються на ранніх стадіях розвитку і пов'язані з просторовою орієнтацією пагонів та листків, яка здійснюється регуляцією ростових процесів через видовження і скручування стебел.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 2

1. Григорюк І. П. Фізіологічні і молекулярні основистійкості видів рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі. / Григорюк І. П., Лук'яненко Т. Л. Монографія. Київ: ЦП «Компринт», 2015. 174 с.
2. Григорюк І. П. Біологія каштанів. / Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В. Київ: Логос, 2004. 380 с.
3. Гузь М. М. Особливості розмноження *in vitro* гіркокаштана звичайного. / Гузь М. М., Гречаник Р. М., Гевал В. Ф. Лісівнича академія наук України: Відтворення та покращення лісових ресурсів. Львів: 2007. Випуск 5. С. 89–91.
4. Демчук Т. Л. Система конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic). / Демчук Т. Л., Григорюк І. П., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д., Клюваденко А. А. Доповіді Національної академії наук України. 2012. №7. С. 144–153.
5. Дрозда В. Ф. Особливості біології, екології та контроль чисельності каштанової мінуючої молі *Cameraria ohridella* Desch. Dimic (Lepidoptera, Gracillariidae) в умовах українського полісся. / Дрозда В. Ф., Кочерга М. О., Мельничук С. Д., Гойчук А. Ф., Брайко В. Б. Науковий вісник НЛТУ України. 2013. Вип.23.2. С. 23–30.
6. Енциклопедія народної медицини: характеристика лікарських рослин та їх застосування. / уклад. і відп. ред. О. Михайлевський. – Львів. «Сполом» 2006. 1284 с.
7. Зерова М. Д. Каштановая минирующая моль в Украине. / Зерова М. Д., Никитенко Г. Н., Нарольський Н. Б. и др. Київ: ТОВ «Вегес», 2007. 87 с.
8. Ліханов А. Ф. Фізіологічна адаптація і стійкість рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka Dimic). / Ліханов А. Ф., Григорюк І. П., Пентелюк О. С., Костенко С. М., Оверченко О. В., Субін О. В. Київ: Компринт, 2017. 160 с.
9. Ліханов А. Ф. Варіативність складу ВМ кори однорічних пагонів рослин роду *Aesculus* L. / Ліханов А. Ф., Пентелюк О. С., Григорюк І. П., Ілленко О. О. Інтродукція рослин. 2016. № 3. С. 102–109.
10. Лук'яненко Т. Л. Пероксидаза – як маркер стійкості рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі. / Лук'яненко Т. Л., Григорюк І. П., Ліханов А. Ф. Карантин і захист рослин. 2014. № 4. С.13–15.
11. Ляшенко Н. И. Физиология и биохимия хмеля. / Ляшенко Н. И., Михайлов Н. Г., Рудык Р.И. Житомир: Полісся, 2004. 408 с.
12. Мельничук М. Д. Будова, розвиток і функції секреторної системи *Hutulus lupulus* (*Cannabaceae*). / Мельничук М. Д., Якубенко Б. Є., Ліханов А. Ф. Український ботанічний журнал. 2013. Т.70. №3. С. 342–350.
13. Пентелюк О. С. Анатомио-фізіологічні ознаки стійкості рослин гіркокаштана звичайного проти каштанової мінуючої молі. / Пентелюк О. С., Ліханов А. Ф., Григорюк І. П. Наукові доповіді НУБіП України. Секція: Біологія, біотехнологія, екологія. 2016. № 3 (60). С. 14–22.

14. Пентелюк О. С. Динаміка вмісту поліфенолів у листках рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) / Пентелюк О. С., Ліханов А. Ф., Григорюк І. П. Біоресурси і природокористування. 2016. Т.8. № 1–2. С. 5–12.
15. Трибель С. М. Каштанова мінуюча міль. / Трибель С. М., Гаманова О. М., Свентославські Я. Київ: Колобіг, 2008. 72 с.
16. Троханяк О. С. Динаміка вмісту поліфенолів у листках рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.). / Троханяк О. С., Ліханов А. Ф., Григорюк І. П. Біоресурси і природокористування. 2016. Т.8. № 1–2.
17. Хомина В.Я. Хміль. / Хомина В.Я., Загородний М.В. 2011. 216 с.
18. Chitra M., Shyamala Devi C. S., Sukumar E. Antibacterial activity of embelin. *Fitoterapia*. 2003. Vol. 74. P. 401–403.
19. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development / 3rd ed. Ray F. Evert. New Jersey: Hoboken, 2006. P. 473–501.
20. Jiang Y., Li P., Li S. P., Wang Y. T., Tu P. F. Optimization of pressurized liquid extraction of five major flavanoids from *Lysimachia clethroides*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. Vol. 43. P. 341–345.
21. Langenheim J. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. Portland, Cambridge: Timber Press. 2003. 586 p.;
22. Matousek J., Novak P., Patzak J., Briza J., Krofta K. Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *Rostlinna Vyroba*. 2002. Vol. 48. P. 7–14.
23. Nagel J., Culley L., Lu Y., Liu E., Matthews P., Stevens J., Pagea J. Est analysis of hop glandular trichomes identifies an o-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell*. 2008. Vol. 20. P. 186–200.
24. Podolak I., Strzalka M. Qualitative and quantitative LC profile of Embelin and rapanone in selected *Lysimachia species*. *Chromatographia*. 2013. Vol. 67. № 9/6. P. 471–475.
25. Roshchina V.V. Fluorescing world of plant secreting cells. Jersey (USA): Science Publisher. 2008. P. 338.
26. Schillmiller A., Last R., Pichersky E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal*. 2008. Vol. 94. P. 702–711.
27. Straw N.A., Williams D.T Impact of the leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and bleeding canker disease on horse-chestnut: direct effects and interaction. *Agricultural and Forest Entomology*. 2013. Vol. 15. P. 321–333.
28. Sudani R.J., Akbari B.V., Vidyasagar G., Sharma P. Development and validation of HPTLC method for simultaneous quantitation of embelin and assay of

marketed formulation. *International Journal of Pharmaceutical Biological Archives*. 2011. Vol. 2(2). P. 652–656.

29. Toth A., Riethmuller E., Alberti A., Vegh K., Kery A. Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. In *European Chemical Bulletin*. 2012. Vol. 1. № 1–2. P. 27–30.

30. Wang G., Tian L., Naveed A., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P., Dixon R. Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop. *Plant Physiol*. 2008. Vol. 148. P. 1254–1266.;

31. Wang N., Mc Allister H.A., Bartlett P. R., Buggs R.J.A. Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus *Betula* (Betulaceae). *Annals of Botany*. 2016. Vol. 117. P. 1023–1035.

32. Weryszko–Chmielewska E., Haratym W. Changes in leaf tissues of common horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) colonised by the horsechestnut leaf miner (*Cameraria ochridella* Deschka Dimić). *Acta agrobotanica*. 2011. Vol. 64 (4). P. 11–22.

33. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2002. Vol. 5. P. 218–223.

34. Xie Ch., Xu L.Z., Luo X.Z., Zhong Z., Yang S.L Flavonol glycosides from *Lysimachia capillipes*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2002. Vol. 4 (1). P. 1–23

### Розділ 3

## ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН У ПРОЦЕСІ ОЗДОРОВЛЕННЯ І МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

За останні роки уявлення щодо ролі фенольних сполук у регуляції життєво важливих процесів рослинних організмів значно розширилися [5]. Доведено, що флавоноїди у клітинах синтезуються у відповідь на сигнали навколишнього середовища і далі виконують різноманітні функції [8, 17]. Останні повідомлення пояснюють механізми впливу флавоноїдів на транспортування ауксинів. Показано, що високий вміст деяких флавононів гальмує базипетальний рух гормонів, який легко відновлюється за умов збільшення концентрації флавонолів [9]. Високі концентрації флавонона нарінгенина уповільнюють розвиток волокон у тканинах бавовнику (*Gossypium hirsutum* L.). Явище гальмування розтягування клітин відбувається на тлі пригнічення експресії генів, відповідальних за синтез ферменту флавонон-3-гідроксилази (F3H), субстратом якого є нарінгенин. Фенольні кислоти і флавоноїди відіграють важливу роль в імунних відповідях рослин, пригнічують патогенні мікроорганізми та гриби [13, 16]. Наприклад, листки і плоди яблуні (*Malus domestica* Borkh), інфіковані патогеном (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter), характеризуються підвищеним вмістом хлорогенової кислоти і кон'югатів кверцетину (рутину, кверцитрину і ізокверцитрину).

У листках малини (*Rubus idaeus* L.) виявлено терпеноїди, глікозиди кверцетину і кемпферолу, антоціани (ціанідин-3-софорозид, ціанідин-3-глікозилрутинозид і ціанідин-3-глюкозид), а також значну кількість дубільних речовин і танінів, до складу яких входить галова і елагова кислоти (елагітаніни, галотаніни) [15]. Елагітаніни і антоціани мають виражені антиоксидантні властивості і захищають тканини та органи рослин від негативної дії внутрішніх та зовнішніх чинників. У плодах малини основні фенольні сполуки представлені елаготанінами і антоціанами [11]. Проте їхній вміст і якісний склад мають сортові відмінності, і залежать від сезонних коливань та умов вирощування рослин. За біохімічними показниками плодів генотипи малини поділяють на три групи: з високим вмістом флавоноїдів (антоціани і кверцетин глікозиди), з високою кількістю органічних кислот і низьким пулом флавоноїдів та рослини з високим вмістом у плодах сухих розчинних речовин [12].

Для фітохімічних досліджень малини звичайної з колекції НУБіП України було відібрано рослинний матеріал десяти сортів: Примара, Козачка, Галинка, Космічна, Осіння, Брусвяна, Барабашка, Промінь, Улюблена Сича, Відбірна. Зразки листків збирали з рослин до початку цвітіння і екстрагували (1:10) 80 %-ним MeOH. Екстракти зберігали у морозильній камері за температури -15-20° С.

Хроматографічне профілювання комплексу фенольних сполук у листках малини проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках Кізелгелль F<sub>254</sub> (Merck, Німеччина) у системі розчинників: етилацетат – мурашина кислота – оцтова кислота – вода (v / v / v / v – 100: 11: 11: 26). На стартову лінію наносили зразки метанольних екстрактів листків дев'яти сортів малини об'ємом 7 мкл. Після просушування хроматограми обробляли 5 відсотковим EtOH розчином AlCl<sub>3</sub>, нагрівали 5 хв при температурі 105°C і досліджували в УФ (365 нм). Спектрофотометричний аналіз фенольних речовин здійснювали на скануючому спектрофотометрі Optizen Pop (Південна Корея). Гістологічний аналіз стебел, а також автофлуоресценцію клітин і тканин вивчали на люмінесцентному мікроскопі AxioScope A-1 Carl Zeiss з використанням п'яти оптичних фільтрів (420–470, 460–500, 505–555, 546–575, 640–690 нм). Фотодокументацію і морфометричні показники аналізували у спеціалізованих програмах Image Pro–Premier 9.1 і AxioVision Carl Zeiss. Статистичну обробку даних, множинний кореляційний та кластерний аналізи проводили за допомогою програми Statistica 6. Хроматографічне профілювання низькомолекулярних полярних, середньо полярних та мало полярних метаболітів, в тому числі головних компонентів фенольного комплексу листків *Rubus sp.*, серед яких гідролізовані таніни – похідні галової та елагової кислот, включаючи їх кон'югати; кон'югати винної, хінної та шикімової з оксикоричними кислотами кофейною, п-кумаровою та феруловою (депсиди типу хлорогенової, ізохлорогенової та неохлорогенової кислот); катехіни та конденсовані таніни (проантоціанідіни); а також флавоноїди (головним чином глікозиди кверцетину та кемпферолу). До того ж, у складі рослинних матеріалів присутні нор-, ди- та тритерпеноїди, а також стерини та їх ефіри.

Зразки листків рослин до та після мікроклонального розмноження екстрагували метанолом протягом доби захищеними від світла при кімнатній температурі, далі в такому стані до проведення хроматографічного розділення зберігали в морозильній камері при – 15...20°C, а безпосередньо перед аналізом фільтрували крізь шприцевий фільтр 0,2...0,5 μm.

Розділення зразків проводили за допомогою обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії на системі Agilent 1100, оснащених 4-канальним насосом, вакуумним дегазатором, автосамплером, термостатом колонок та діодно-матричним детектором. Використовували 2-елюентну схему (елюент I = 0,05 М водний розчин ортофосфорної кислоти; елюент II = ацетонітрил) на колонці Thermo Scientific Hypersil™ BDS C<sub>18</sub>, 3 μm, 2.1×100 mm з паспортною роздільною здатністю 12000 т.т., що забезпечує прийнятну ефективність аналізу. Об'єм зразка 5 μl, термостатування колонки 20°C та після 45 хв 40°C, швидкість потоку 0,2 мл/хв та після 40 хв – 0,6 мл/хв; час аналізу до 80 хв, профіль елюювання – ізократично 1% елюент II в елюенті I протягом 2 хв, далі – лінійний градієнт від 1% до 99% II в I за 40 хв, наприкінці ізократа 99% II в I протягом 20 хв і більше. Базове детектування

обирались на 206 та 254 нм, додаткові довжини хвиль обиралися за необхідністю. Оскільки при такому короткохвильовому детектуванні не вдається повністю виключити дрейф базової лінії, від хроматограм зразків віднімалась «холоста» хроматограма (*subtraction blank run*). У такому вигляді хроматограми представляли графічно. Для полегшення інтерпретації значущі фрагменти хроматограм були накладені одна на одну (*overlaid*), тож якісна і кількісна різниця виявлялася краще.

### 3.1. Анатомо–гістохімічні особливості вегетативних органів малини

Для дослідження анатомо–гістохімічних особливостей вегетативних органів були використані рослини сортів малини звичайної (*Rubus idaeus*) (рис. 3.1). Малина звичайна або європейська – квіткова рослина родини розових (*Rosaceae*), колючий напівкущ, має річні вегетативні пагони і здерев'янілі дворічні стебла, висотою 0,5–1,8 м [1, 2].



Рисунок 3.1. Малина звичайна (*Rubus idaeus*)

На основі проведеного нами хроматографічного профілювання продуктів вторинного метаболізму у листках малини досліджуваних сортів було визначено гідролізовані таніни – похідні галової та елагової кислот [14], включаючи їх кон'югати (винної, хінної та шикімової з оксикоричними кислотами), кавовою, п–кумаровою та феруловою (депсиди типу хлорогенової, ізохлорогенової та неохлорогенової кислот); катехіни та конденсовані таніни (проантоцианідіни); а також флавоноїди (головним чином глікозиди кверцетину та кемпферолу). До того ж, у складі рослинних матеріалів були присутні нор–, ди– та тритерпеноїди, а також стерини та їх ефіри. Співвідношення біохімічних складових залежало від сорту, фази вегетації, впливу на рослини абіогенних та біогенних стресових чинників. Від цього, відповідно, залежали загальний стан рослини і якісні показники плодів. Вторинні метаболіти листків малини досліджуваних нами сортів за якісним складом виокремлювались у дві основні групи – фенольна та терпеноїдна. На початкових стадіях розвитку у молодих листках накопичувалась значна кількість терпеноїдів. З часом їхній вміст зменшувався на фоні збільшення



загального пулу флавоноїдів та оксикоричних кислот, зокрема кавової, ферулової та п-кумарової. Слід відзначити, що у листках малини нами не виявлена саліцилова кислота, проте у сортів Примара і Галинка було ідентифіковано її метильовану форму – метилсаліцилат, який завдяки високій ліпофільності легко долає мембранні бар'єри органоїдів, плазмалеми і виконує сигнальні функції на міжклітинному рівні.

За результатами аналізу автофлуоресценції тканин стебла було з'ясовано, що висока концентрація оксикоричних кислот, у тому числі ферулової, для якої характерне інтенсивне світіння у блакитному спектрі, виявлялась у вторинних клітинних стінках елементів ксилеми на початку здерев'яніння тканин, а також у клітинах периферійної зони склеренхімних волокон (рис. 3.2).

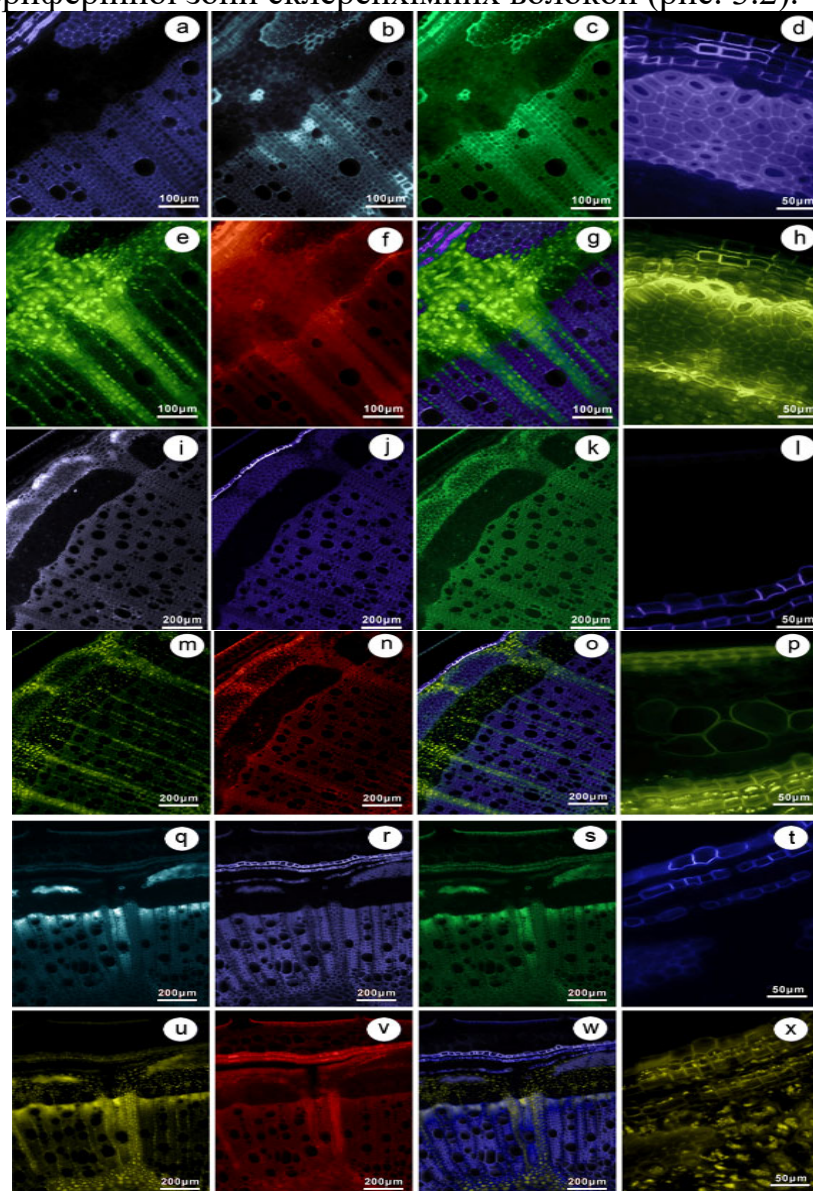


Рисунок 3.2. – Автофлуоресценція вторинних метаболітів у тканинах стебла малини сортів Осіння (а–h), Галинка (і–р), Брусвяна (q–x): оптичні фільтри (a,d,j,l,r,t) – 420–470 нм; (b,i,q) – 460–500 нм; (c,k,s) – 505–555 нм; (e, h,m,p,u,x) – 546–575 нм; (f,n,v) – 640–690 нм

У рослин малини розподіл оптично активних метаболітів, їх вертикальний і радіальний транспорт по стеблах має деякі сортові відмінності. Топологічно у первинній корі стебла малини виділяється екзокортекс, створений з декількох шарів здерев'янілих дещо облітерованих клітин, мезокортекс, представлений великими клітинами паренхіми та ендокортекс, до складу якого входять один, два або іноді три шари клітин ендодерми, між якими розташовані ряди клітин з високим вмістом крохмалю. За морфологією клітини ендодерми таблитчасті, тангентально витягнуті, з щільно зімкненими радіальними стінками. Така будова створює необхідні умови для ефективної регуляції радіального транспорту речовин між первинною корою і стелою. Клітини ендодерми яскраво світилися у діапазоні довжини хвиль 420–470 нм.

Зосередження оптично активних компонентів у клітинних стінках тканин було нерівномірним. Найінтенсивніша автофлуоресценція, характерна для фенолкарбонових кислот, була виявлена в антиклінальних (радіальних) та внутрішніх тангентальних (поперечних) стінках. Результати анатомічного аналізу стебел дев'яти сортів малини показали, що найпластичнішими елементами в їх будові є серцевинні промені і ендодерма, основні відмінності яких пов'язані з морфологією, загальною розвиненістю тканин і зосередженням у протопластах і клітинних стінках оптично активних сполук. Так, у малини сорту Осіння ендодерма представлена трьома рядами таблитчастих клітин із здерев'янілими стінками, а у сортів Брусвяна і Осіння вона одно- або дворядна. Клітинні стінки інтенсивно автофлуоресціюють у синьому (420–470 нм) спектрі. Яскраве світіння у блакитному спектрі (480 нм), характерне для фенолкарбонових кислот, спостерігалось у луб'яних волокнах і прикамбіальній зоні ксилеми. Люмінесценція фенольних сполук до та після обробки хромогенними реактивами спрощує можливість їхньої ідентифікації на свіжих зрізах [3].

З огляду на умови проведених нами вегетаційних дослідів (просторова ізоляція корневих систем і пагонів, відсутність комах–переносників), горизонтальний перенос вірусів від хворих рослин до здорових виключений. Вертикальний перенос вірусів у рослинному організмі, як відомо, відбувається за допомогою дальнього (пасивний транспорт віріонів з уражених ділянок з током асимілянтів по елементах провідної системи в усі тканини рослин, включно з репродуктивними) і ближнього транспорту (по плазмодесмах – від клітин до клітин).

У вегетативних органах рослин роду *Rubus* існують і ефективно діють тканинні й клітинні бар'єри, які утворюються відкладеннями калози, суберину і ранєвого лігніну та перешкоджають вільному транспорту вірусних часток по симпласту від клітини до клітини, а також нисхідним током метаболітів з інфікованих вегетативних органів у здорові. Відомо, що калоза у рослинному організмі виконує захисні та регулюючі функції. Її синтез індукується збільшенням загального пулу іонів кальцію в цитоплазмі рослинних клітин, дією елісаторів, механічними впливами. Відкладення калози, як динамічної

компоненти клітинної стінки рослин, регулює транспорт асимілятів в тканинах, створює умови для часткової або повної ізоляції протопластів клітини від дії зовнішніх факторів. Під впливом вірусної інфекції на перших стадіях розвитку патогенезу у листках малини і ожини значно збільшується загальний пул фенолкарбонових кислот і тритерпенових сапонінів. Розподіл оптично активних метаболітів у тканинах черешка листка представлено на рис. 3.3. Найнасиченішою флавоноїдами є паренхіма кори, яка інтенсивно поглинає ультрафіолетові промені і має високий коефіцієнт емісії у зеленому спектрі. Найвища концентрація ферулової, п-кумарової та інших фенолкарбонових кислот виявляється у ксилемі та зоні механічного пучка склеренхіми, де за участю пероксидази відбувається утворення лігніну (рис. 3.2, а).

На комбінованому зображенні фрагмента поперечного зрізу черешка чітко визначається локалізація флавоноїдів, які зосереджені навколо провідного пучка і у корі. Оскільки кожна з цих груп фенольних сполук має певні відмінності у шляху їх утворення, стає очевидним, що фенілпропаноїдний шлях утворення оксикоричних кислот і халконсинтазний шлях утворення флавоноїдів синхронізовані не лише у часі, але й у просторі. За кожний з цих процесів відповідають певні тканини, у клітинах яких існують внутрішні чинники, які регулюють активність ключових ферментів цих процесів фенілаланін аміак-ліази і халконсинтази.

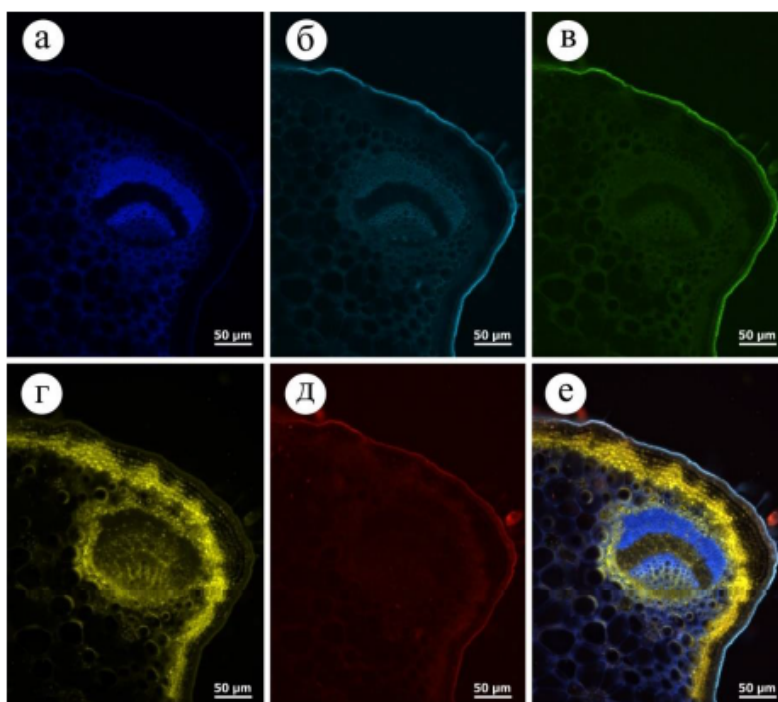


Рисунок 3.3. – Автофлуоресценція метаболітів у тканинах черешків *Rubus idaeus* у різних спектрах емісії: а – 445 нм; б – 480 нм; в – 530 нм; г – 580 нм; д – 640 нм; е – комбіноване зображення фрагменту черешка у синьому, зеленому і жовтому спектрах

Рослини малини та смородини характеризуються активним синтезом вторинних метаболітів. Значна їх кількість за центром синтезу і просторовою

локалізацією пов'язана з хлоропластами, гранулярним ретикулюмом, мітохондріями. Подальший розподіл фенольних сполук рослинним організмом залежить від їхнього призначення [10]. Великий інтерес представляють секреторні клітини, прості трихоми, які у значній кількості утворюються на абаксильній поверхні листків, утворюючи, таким чином, густе, достатньо щільне павутинисте опушення. Протопасть трихом живий, має густу зернисту цитоплазму та одне ядро (7–8 мкм). За допомогою люмінесцентної мікроскопії на вдалось виявити особливості біохімічного складу трихом та характер розподілу речовин у клітинній структурі. Цілком очевидно, що до основних компонентів фенольних сполук у цитоплазмі трихом відносяться терпени (b) і флавоноїди (c, d).

Оксикоричні кислоти виявляються лише у базальній частині трихомів і, ймовірно, транспортуються туди з клітин епідермісу, що генетично з ними пов'язані. Слід зазначити, що вміст терпенів і флавоноїдів у трихомах у декілька разів вищий за клітини епідермісу і кори, що чітко визначається за інтенсивністю автофлуоресценції на поперечних зрізах живих тканин черешка малини (рис. 3.4).

Головними компонентами фенольного комплексу листків *Rubus sp.* є гідролізовані таніни – похідні галової та, особливо, елагової кислот, включаючи їхні кон'югати; кон'югати винної, хінної та шикімової з оксикоричними кислотами кавовою, п-кумаровою та феруловою (депсиди типу хлорогенової, ізохлорогенової та неохлорогенової кислот); катехіни та конденсовані таніни (проантоціанідіни); а також флавоноїди (головним чином глікозиди кверцетину та кемпферолу).

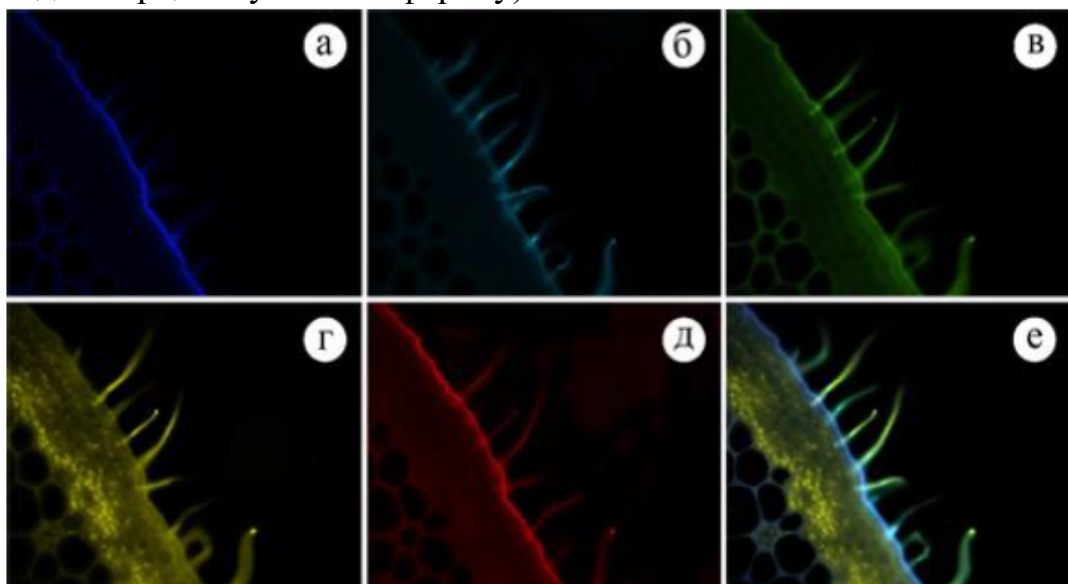


Рисунок 3.4. – Автофлуоресценція волосків на черешках *Rubus idaeus* у різних спектрах емісії: а – 445 нм; б – 480 нм; в – 530 нм; г – 580 нм; д – 640 нм; е – комбіноване зображення 445 і 580 нм

Для успішного вирощування рослин малини *in vitro* у живильні середовища (ЖС) вносять сполуки заліза, міді, кобальту та інших біогенних металів. Залізо використовується у формі хелатного комплексу з ЕДТА. Проте



відомо, що залізо у вигляді наночасток позитивно впливає на ріст культурних рослин [4]. Це дозволяє розглядати його як перспективну мікродобавку. Сучасні технології отримання наночасток різних матеріалів можна умовно розділити на три основні групи: у першій – утворення наночастинок у результаті об'єднання атомів і молекул, у другій – методом диспергування об'ємних матеріалів, у третій – отримання наночастинок об'єднанням двох вищезгаданих методів.

Для використання наночасток як ефективною транспортною системою для перенесення різноманітних біогенних металів через клітинні мембрани необхідно забезпечити біосумісність наноматеріалу. Для цього наноматеріал не повинен мати токсичних домішок. Ідеальною наносистемою є сполучення наночастинок з молекулами води, а також з молекулами біосумісної рідини. Такі наноматеріали можна, наприклад, додавати в розчини, в яких зберігаються або вирощуються клітини або тканини.

Фізіологічну активність наноаквахелатного комплексу заліза (НХЗ) вивчали на рослинах малини звичайної (*Rubus idaeus* L.) ремонтантного сорту Брусвяна. За еталонну нами була прийнята концентрація іонів двоховалентного заліза, яка рекомендована для приготування стандартного живильного середовища Мурасіге – Скуга. Вплив реагенту вивчали на серії розчинів з кроком концентрації 330 мкг/мл. У експерименті, як базове використовували середовище MS у трьох модифікаціях. Всього було використано чотири варіанти живильного середовища (рис. 3.5).

- перше з Fe-хелат: MS (200 мл), Fe-хелат (1,25 мл)
- друге без Fe-хелат: MS(200 мл), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,342 г)
- третє з додаванням Fe-nano: MS(200 мл), Fe-nano 1:1 (2,78 мл), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,342 г)
- четверте з концентрацією Fe-nano 1:10 : MS(200 мл), Fe-nano (0,278 мл), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,342 г), агар 1,7 г.

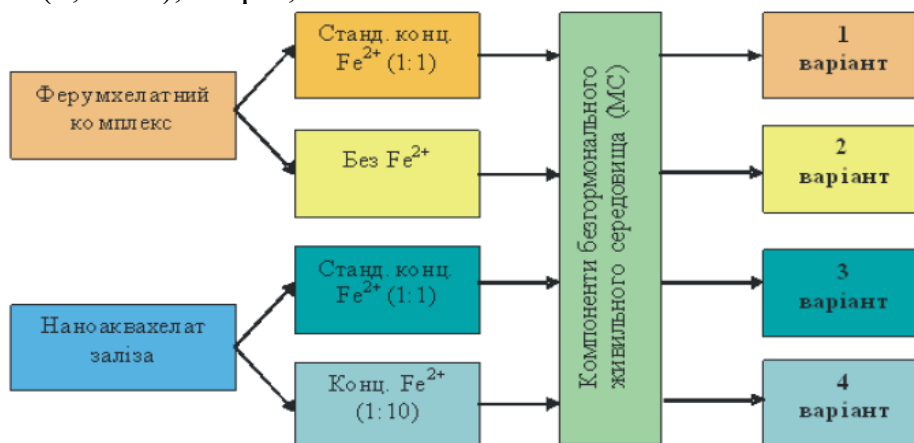


Рисунок 3.5. – Приготування живильних середовищ для експериментального дослідження впливу наноаквахелатного комплексу заліза на тест-рослини *Rubus idaeus* L.

У діагностиці дефіциту або надлишку заліза досить інформативними є ознаки анатомічної будови провідної, механічної й асиміляційної тканин, стан



пластидного комплексу. Окрім того, залізо необхідне для формування молекул хлорофілу, багатьох ферментів, у тому числі пероксидази, яка виконує захисні та конституційні функції, бере участь у складних процесах диференціації клітин та гормональної регуляції рослинного організму.

Чутливість специфічних гістохімічних реакцій на вміст у рослинних тканинах іонів заліза дуже висока, тому при приготуванні діючих реагентів, доборі проб, фіксації матеріалу й виготовленні зрізів дотримувались особливої старанності. Готування зразків тканин рослин *Rubus idaeus* L., які вирощені на безгормональних живильних середовищах, з додаванням наноаквахелату заліза, в умовах *in vitro* проводили загальноприйнятими у гістохімії методиками. Тканини рослини, які були вирощені на середовищах з різним вмістом та формою хелатів заліза, а також в умовах гострого Fe-дефіциту фіксували одразу після вилучення з живильного середовища. При відборі фрагментів живих тканин *Rubus idaeus* для гістохімічного аналізу враховували стадії вегетації рослин, їх вік, а також час відбору проб. Добова динаміка вмісту в листках вуглеводів загальновідома, те ж нами було встановлено й для іонів заліза. Крім того, проводили повторне вивчення асиміляційних органів у динаміці їхнього розвитку під час вегетації. Для забезпечення репрезентативності вибірки проби з кожного варіанту досліду відбирали у 10 повторях.

Залежно від об'єкту цитологічних та гістохімічних досліджень використовували декілька методів фіксації рослинних тканин: для вивчення ядерного апарата – фіксатор Кларка; для вивчення хлоропластів – суміш Гамалунда, для вивчення структурних елементів провідної системи – фіксатор Карнуа. Для значної частини матеріалу було використано універсальний фіксатор Чемберлена, який м'яко діє на слабо здерев'янілі тканини, упереджує деформацію клітинних структур і зберігає цілісність пластид.

Для виявлення в тканинах іонів заліза використовували специфічну і досить чутливу реакцію з фероціанідом калію.

*Склад реактивів для цієї реакції наступний:*

*2 мл концентрованої соляної кислоти, 2 мл 10%-го водяного розчину фероціаніду калію, 96 мл бідистильованої води. Приготовлені розчини зберігали в склянці з темного скла із притертою пробкою.*

Для проведення гістохімічних досліджень фіксований матеріал зневоднювали в серії спиртів, а потім – у хлороформі. Далі матеріал протягом двох тижнів просочували парафіном. Залитий у парафін матеріал формували в блоки та нарізали на санному мікротомі. Товщина зрізів – 10–12 мкм. Мікротомні парафіновані зрізи проводили через серію розчинників: ксилол – n-бутанол – етиловий спирт, далі поміщали препарат в реагент на 1 годину, потім його переносили в бідистильовану воду, проводили підфарбування тканин карміновим сафраніном. У результаті проведених реакцій відкладення заліза в тканинах забарвлювалися в синій колір. Клітинні оболонки – у

червоний, цитоплазма – у блідо рожевий. Далі зрізи збезводнювали в серії спиртів, ксилолі й заключали в канадський бальзам.

Після приготування середовищ з наноаквахелатами заліза, матеріал було введено в культуру *in vitro*. На рисунку 3.6 представлені експлантати малини сорту Брусвяна на четвертий тиждень культивування. На середовищі без заліза у експлантатів малини спостерігалось гальмування процесів утворення коренів другого порядку. Кореневі волоски, які в нормі добре розвиваються в зоні всмоктування, за умов дефіциту заліза майже не формувались. Бічні корені другого порядку краще розвивались на середовищі з Fe-хелатним комплексом в умовах низького та середнього рівня освітленості (1500 – 2000 Лк). На середовищі без заліза коренева система у досліджуваних рослин розвивалась значно повільніше порівняно з контролем (вар. №2), але спостерігалася тенденція до покращення росту коренів при збільшенні кількості світла (понад 3000 Лк), тобто була визначена тенденція протилежна до контролю. Рослини-регенеранти малини, які були вирощені на живильних середовищах з додаванням Fe-хелату активно росли. Листкові пластинки мали характерне яскраво-зелене забарвлення. У рослин, що вирощувались на живильних середовищах без додавання заліза, спостерігались хлоротичність листків, який виявлявся на фоні загального пригнічення росту (рис. 3.6, б).

На живильному середовищі з додаванням наноаквахелату заліза 1:1 також спостерігалось зелене забарвлення листочків, без пошкоджень та активний ріст. Проте за умов зменшення кількості заліза (НХЗ) в живильному середовищі у співвідношенні – 1:10 призводило до поступового розвитку хлорозу листків малини сорту Брусвяна. Коренева система при культивуванні експлантатів малини звичайної в умовах *in vitro*, на середовищах з стандартною концентрацією Fe-хелатного комплексу (вар. №1) розвивалася більш інтенсивно, ніж на середовищах без додавання залізовмісних сполук (вар. №2).

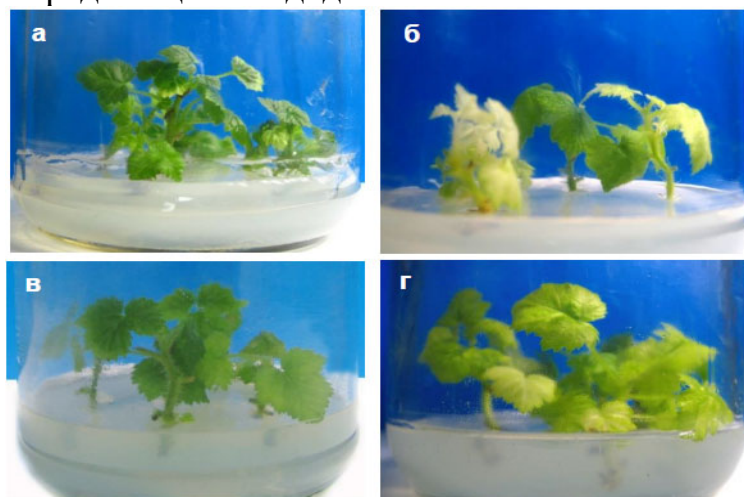


Рисунок 3.6. – Експлантати малини сорту Брусвяна на 4-й тиждень культивування: а – на базовому живильному середовищі MS; б – на MS без додавання ферум-хелатного комплексу; в – на MS з додаванням Fe-nano (1:1); г – на MS з додаванням Fe-nano (1:10)

У рослин, що вирощувалися на стандартних живильних середовищах, листки (вар. №1) були нормальної еліптичної або яйцевидної форми та мали тенденцію до скручування. На середовищі без заліза (вар. №2) листки протягом всього експерименту були жовто–зеленого кольору з не дуже виявленими хлоротичними плямами в міжжилкових ареолах, тонкими пластинками витягнутої форми, які були дещо скручені назовні.

У дослідах з додаванням у живильне середовище МС наноаквахелату заліза (вар. №3–4) листки були темно–зеленими з вираженим тургором, еліптичної або яйцеподібної форми. Корені у рослин, що вирощувались на середовищах з наноаквахелатом заліза в порівнянні з контролем (вар. №1 і №2), були наявні у більшій кількості, але коротші і тонші в діаметрі, з недостатньо розвиненими кореневими волосками.

Зовнішні симптоми хлорозу листів, можливо, у першу чергу були пов'язані зі станом пігментного комплексу, кількістю хлорофілів і каротиноїдів. Процес уповільнення синтезу хлорофілів а і b у мезофілі мав пролонгований характер, що, імовірно, пов'язано із залишковим вмістом мікроелементу в тканинах експлантата, з його активним і пасивним транспортом в організмі рослини.

З часом збільшення рослинної біомаси в культурі, загострювало дефіцит мікроелемента в організмі рослини і його прояви ставали дедалі яскравішими. Наприкінці четвертого тижня культивування хлоротичні зміни листків набували системного характеру, що притаманно рослинам, які ростуть в умовах гострого дефіциту заліза. Хлоротичні зміни у рослин спостерігались тотально, майже по всіх поверхнях листових пластинок: від їх основи – до верхівки.

У нормі формування листової пластинки головним чином залежить від активності маргінальних меристем, процесу розтягнення та диференціації клітин. Поділ меристематичних клітин без розтягнення призводить до дрібноклітинності мезофілу, епідермісу та інших структурних елементів листка. В експерименті найбільш чутливим до хімічної форми та вмісту заліза виявився показник ширини листової пластинки. При збільшенні іонів наноаквахелату заліза в живильному середовищі до концентрації, що відповідає стандартному середовищу, ріст перших листків достовірно не відрізнявся. Третій листок більш активно розвивався у рослин на стандартних середовищах. Порівняно з середовищами, в які було внесено еквівалентну до стандарту кількість наноаквахелатів заліза (вар. №3), показники росту листків в ширину і довжину на середовищах з ферумхелатними комплексами були в 2–3 рази вищими. Динаміка ростових процесів рослин протягом циклу їх культивування зазнавала суттєвих змін. Поступове виснаження живильного середовища, збільшення розмірів та кількості метамерів, накопичення продуктів вторинного метаболізму рослин, призводило до появи симптомів втрати їхньої життєздатності: зниження тургору листків, хлорози, призупинення ростових процесів тощо. Хлорози поступово проявлялись і на листках рослин, що вирощувались на стандартних середовищах. Однак, слід



середовищі з (а) та без (б) ферум халатного комплексу; (в) – екстракти листків рослин, які адаптовані до умов *in vivo*; В – проантоцианідіни (конденсовані таніни); А<sub>1</sub> – галотаніни, А<sub>2</sub> – елагітаніни, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> – терпеноїди, Н – флавоноли (кемпферол 3–глюкозид 7–ксилозид; кверцетин 3–глюкозид 7–ксилозид); зірочками позначені пігменти листків – хлорофіли, каротиноїди, ксантофіли

До того ж, у складі метанольних екстрактів листків малини сорту Брусвяна присутні ди– та тритерпеноїди. Взагалі, внаслідок кислотного гідролізу, в листах малини утворюються три основні фенольні речовини – елагова кислота, кверцетин та кемпферол. Ці речовини здатні до інтенсивної флуоресценції (рис. 3.8).

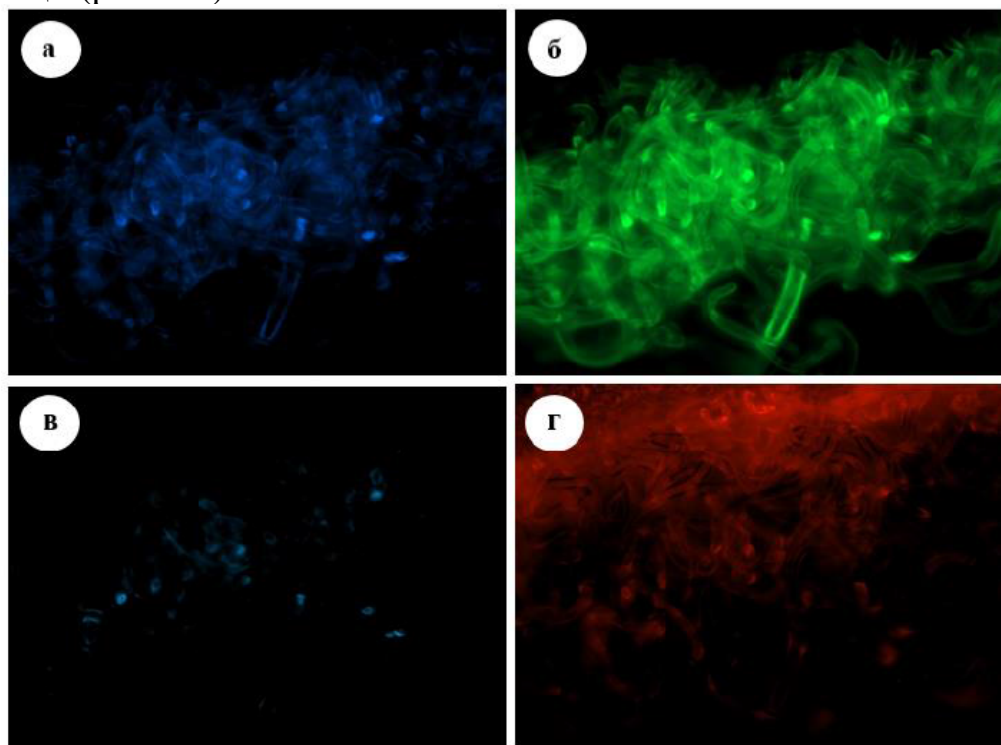


Рисунок 3.8. Аптофлуоресценція листків малини сорту Брусвяна: спектри емісії – а) 420–470 нм; б) 460–500 нм; в) 505–555 нм; г) 640–690 нм

Хроматографічний аналіз вегетативних органів *Rubus sp.* показав, що головними компонентами фенольного комплексу листків малини є гідролізовані таніни – похідні елагової та галової кислот, включаючи їх кон'югати, а також кон'югати винної, хінної та шикімової кислот. Крім того, було виявлено кавову, п–кумарову та ферулову кислоти (депсиди типу хлорогенової, ізохлорогенової та неохлорогенової кислот); катехіни та конденсовані таніни (проантоцианідіни); а також флавоноїди (головним чином глікозиди кверцетину та кемпферолу). На хроматограмах біохімічні компоненти з часом утримання 25–35 хв є моноглікозидами елагової кислоти та флавоноїдів – кверцетину, кемпферолу, ізорамнетину. До того ж, у складі MeOH екстрактів листків малини сорту Брусвяна були визначені ди– та тритерпеноїди.

Внаслідок кислотного гідролізу в листках утворюються три основні фенольні речовини – елагова кислота, кверцетин та кемпферол, які здатні до

інтенсивної флуоресценції, що дозволяє виявляти ці речовини за характерним світінням у живих клітинах.

Нами експериментально встановлено, що в листках малини сорту Брусвяна в культурі *in vitro* за умов дефіциту заліза значно знижується загальний вміст терпеноїдів і флавонолів, зокрема кемпферол 3-глюкозид 7-ксилозиду та кверцетин 3-глюкозид 7-ксилозиду. Додавання у живильне середовище наноаквахелату заліза (НХЗ) стимулює утворення хлорофілів, проте суттєво не впливає на синтез вторинних метаболітів. Виявлена нами особливість НХЗ обумовлена унікальними фізико-хімічними властивостями і структурою хелатного комплексу і відкриває перспективи для проведення спеціальних досліджень щодо синтезу фенольних сполук в тканинах листків.

Враховуючи складний біохімічний контент волосків, у складі якого є легколетючі речовини, які за належних умов мають здатність до активного випаровування і створення локальної специфічної атмосфери навколо листків і всієї рослини. Враховуючи, що значна частини таких речовин є біологічно активною, можна припустити: через них рослина може контролювати ріст і розмноження епіфітну міко- та мікробіоту. Проте відповідь на це питання залишається відкритим.

В нормальних умовах у хлоропластах мезофілу здорових листків відбувається активний синтез лейкоантоціанідів і флавонол-глікозидів. Частина з них транспортується по дрібних провідних пучках, і далі - через центральну жилку в інші органи рослини. Значна кількість фенольних сполук, що синтезується у листках за шикиматним і ацетатно-малонатним шляхом, мають здатність до автофлуоресценції, яка дозволяє визначати центри синтезу і накопичення речовин, спостерігати їх рух тканинами рослини, а також досліджувати деякі процеси біохімічної трансформації продуктів метаболізму в процесі пластичного обміну.

До таких речовин відносяться флавоноїди, флавонол-глікозиди, фенолкарбонові кислоти (елагова, кумарова, кавова, саліцилова, транскорична), яких особливо багато у листках малини та смородини. Результати люмінесцентної мікроскопії свіжозрізаних листків малини показали, що у синьому спектрі (420–460 нм) найбільший квантовий вихід спостерігався у клітинах верхнього і нижнього епідермісів, а також у цистолітах та ідіобластах. Максимальне поглинання ультрафіолетового світла (340–390 нм) було виявлено нами в клітинах стовпчастої і губчастої паренхіми. Цей спектр поглинання відповідає максимуму (380 нм), який характерний для флавонол-глікозидів. У уражених вірусами рослин найінтенсивнішою визначена флуоресценція листків у блакитному (460 – 500 нм) і жовто-зеленому (546–575 нм) спектрах.

Фенольні речовини виявляють достатньо високу активність у регуляції ферментативного каталізу, а також чутливість рослинних клітин до гормональних стимулів і, таким чином, впливають на біохімічний фон рослини, її анатомічні та мофо-фізіологічні особливості, які покладені до



ключових ознак визначення сортів малини, їхньої стійкості до фітопатогенів, у тому числі вірусної природи.

На тонкошаровій хроматограмі показано розділення біохімічних компонентів фенольних сполук дев'яти сортів малини. Всього з метанольних екстрактів листків нами виділено 19 сполук з показниками  $R_f$  у діапазоні від 0,05 до 0,98. Оксикоричні і бензойні кислоти виявляли виражену люмінесценцію у синьому і блакитному спектрах (верхня і середня частини хроматограми). Таніни (нижня частина) навпаки інтенсивно поглинають ультрафіолетове світло і легко помітні через затемнення, а флавоноїди мають інтенсивну люмінесценцію у помаранчевому, жовтогарячому, жовтому, зеленому і блакитному тонах після обробки пластинки хлоридом алюмінію.

На основі проведеного нами хроматографічного розділення продуктів вторинного метаболізму було з'ясовано, що комплекс фенольних сполук, терпенів, стеринів, фосфоліпідів, їхня загальна кількість і якісний склад у листках малини є динамічними (рис. 3.9).

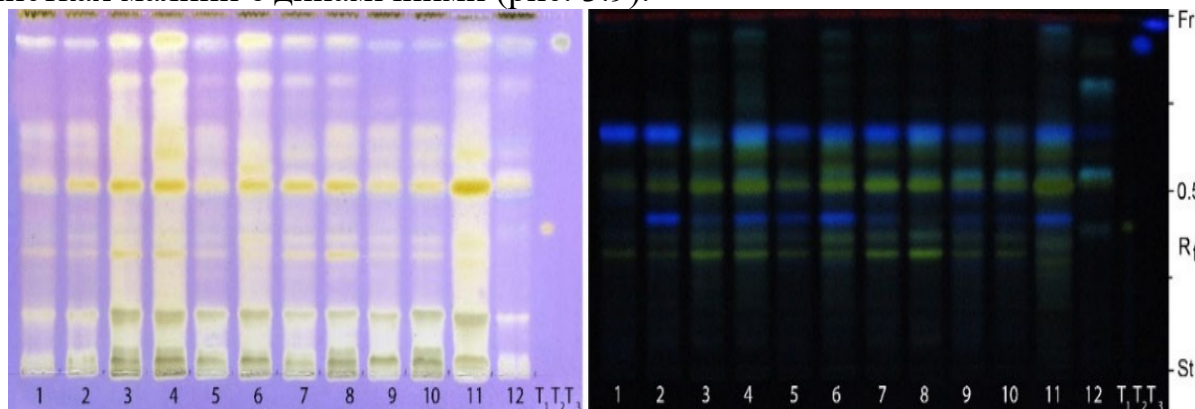


Рисунок 3.9 – Хроматограма флавоноїдів листків різних сортів малини: 1– Галинка; 2 – Примара; 3 – Промінь; 4 – Космічна; 5 – Відбірна; 6 – Улюблена Сича; 7 – Брусвяна; 8 – Казачка; 9 – Барабашка; Т – стандарти: рутин і саліцилова кислота

Співвідношення біохімічних складових залежить від сорту, фази вегетації, впливу на рослину абіогенних та біогенних стресових чинників. Від цього відповідно залежить загальний стан рослини, змінюються лікарські властивості та якісні показники основного цільового продукту вирощування культури – збірних костянок. Досліджені нами сорти малини за загальним пулом вторинних метаболітів характеризуються двома основними групами – фенольна та терпеноїдна. На початкових стадіях розвитку у молодих листках накопичується значна кількість терпеноїдів. З часом їх вміст зменшується на фоні збільшення загального пулу флавоноїдів та оксикоричних кислот, зокрема кавової, ферулової та п-кумарової. Слід зазначити, що у листках малини нами не виявлена саліцилова кислота, проте у сортів Примара і Галинка ідентифіковано її метильовану форму – метилсаліцилат (рис. 3.10), який завдяки високій проникненій здатності легко долає мембранні бар'єри органодів і плазмалеми, виконуючи сигнальну функцію.

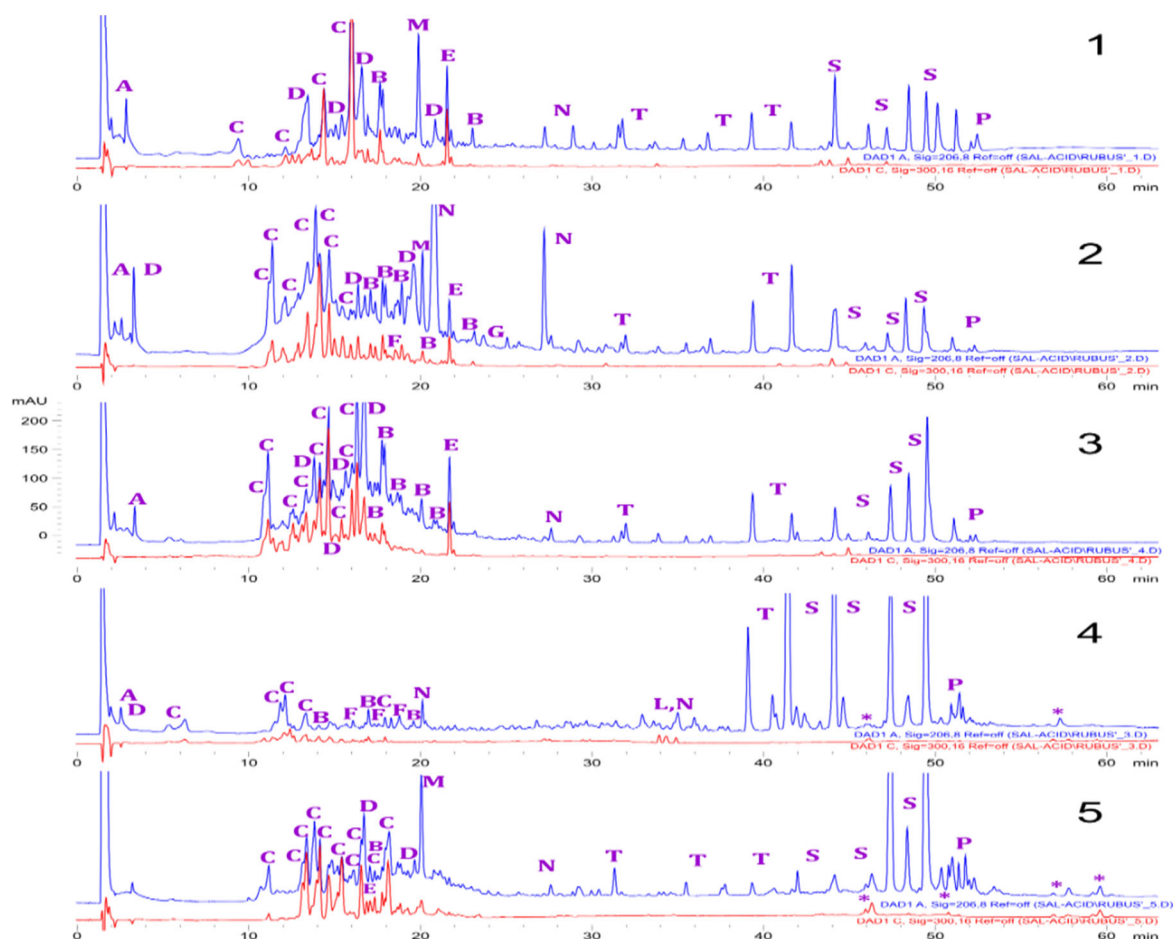


Рисунок 3.10. – Хроматографічні профілі екстрактів листків малини звичайної *Rubus idaeus*: 1 – сорт Примара; 2 – Галинка; 3 – Херітейдж; 4 – Брусвяна в культурі *in vitro*; 5 – Брусвяна після адаптації *in vivo*. Умовні позначки: А – галова кислота та галати (галотаніни); С – оксикоричні кислоти (кавова, п-кумарова, ферулова) та їх кон'югати з винною, хінною, шикімовою кислотами (хлорогенові тощо), вуглеводами та амінами; В – елагова кислота та елагітаніни; D – конденсовані таніни (проантоціанідини); Е – інші таніни (похідні педункулагіну і сангвіїну); F – флавоноїди та їх глікозиди; G – аліфатичні кислоти та лактони; L – лігнани; M – оксibenзойні кислоти та їх деривати (саліцилова кислота, метилсаліцилат); N – нортерпеноїди та їх глікозиди; T –ди- та тритерпеноїди та їх глікозиди (сапоніни); S – стерини та їх ефіри; P – фосфоліпіди. Зірочками позначені пігменти листків та їх деривати – хлорофіли, хлорофіліди, феофітини, феофорбіди, каротиноїди, ксантофіли тощо. Співвіднесення піків є імовірним і не виключає подальшої ідентифікації

Нами також було з'ясовано, що в листках малини сорту Брусвяна в культурі *in vitro* значно збільшується загальний вміст терпенових сполук (рис. 3.11). До того виявляються нові не ідентифіковані нами терпени та їх глікозиди (тритерпенові сапоніни), які не притаманні рослинам *in situ*. Цілком можливо, що ці продукти метаболізму є резервними ендогенними факторами відновлення організму, мають високу біологічну активність, у тому числі протівірусну.

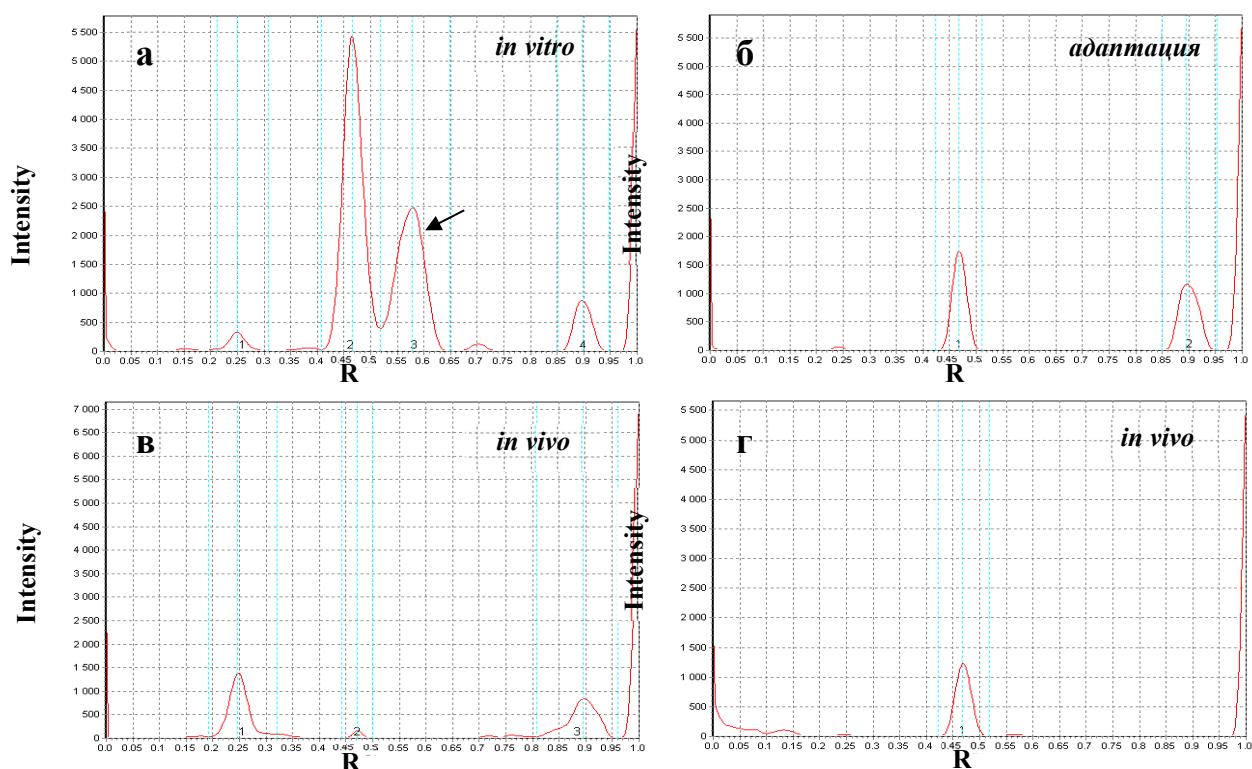


Рисунок 3.11 – Склад та інтенсивність специфічного забарвлення тритерпенових сапонінів *Rubus idaeus*: малина сорту Брусвяна у культурі *in vitro* (а), за умов адаптації після культури *in vitro* (б), в умовах *in vivo* (в), малина сорту Галинка в умовах *in vivo* (г)

За результатами тонкошарової хроматографії було встановлено, що показник утримання тритерпенового сапоніну на шарі сілікагеля відповідає  $R_f$  0,58. Речовина за аналогічним показником  $R_f$  виявлено також у листках сорту Осіння, але у значно меншій кількості (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Сортоспецифічний склад тритерпенових сапонінів за різних умов культивування рослин малини (*Rubus idaeus*)

Сорт	№ на хроматограмі	Умови культивування	Значення $R_f$			
			0,25	0,47	0,58	0,9
Примара	1	<i>in vivo</i>	–	0,47	–	–
Галинка	2	<i>in vivo</i>	–	0,47	–	–
Брусвяна	3	<i>in vivo</i>	0,25	0,47	–	0,9
	4	<i>in vitro</i>	0,25	0,47	<b>0,58</b>	0,9
	5	адаптація	–	0,47	–	0,9
Осіння	6	<i>in vivo</i>	–	0,47	0,58	–

У рослин, що переносяться з живильних середовищ у субстрат на адаптацію синтез сапонінів зменшується, проте активізуються процеси синтезу флавоноїдів і фенол карбонових кислот. Ближче до кінця вегетації загальний пул сапонінів, терпенів і флавоноїдів знижується, а конденсованих танінів збільшується. У цей період росте заселеність вегетативних органів епіфітною мікобіотою, серед яких є представники потенційних збудників хвороб.

### **3.2. Динаміка активності пероксидаз у тканинах вегетативних органів українських сортів малини на різних етапах морфогенезу в умовах *in vitro***

Для визначення показників фізіологічної активності біогенних металів, що входять до складу живильного середовища суттєве значення мають дані щодо анатомічної будови органів рослин. За нашими даними, введення в живильні середовища комплексів мікроелементів у формі їх наноаквахелатів істотно змінюють морфо-фізіологічні показники тест-об'єктів, впливають на їхні конституційні ознаки, швидкість і напрямок обмінних процесів, у тому числі підвищують активність основних оксидаз (пероксидаз, поліфенолоксидаз, оксидісмутаз тощо).

У діагностиці дефіциту або надлишку заліза досить інформативними є ознаки анатомічної будови провідної, механічної й асиміляційної тканин та пігментний склад пластидного комплексу. Окрім того, залізо необхідне для формування молекул хлорофілу, багатьох ферментів, у тому числі пероксидази, яка виконує захисні та конституційні функції, бере участь в складних процесах диференціації клітин та гормональної регуляції рослинного організму. Визначення активності пероксидази та поліфенолоксидази в тканинах листків рослин на різних етапах органогенезу проводили в буферних розчинах (рН = 4,7; 6,7; 7,3) фотокалориметрично за Бояркіним.

Встановлено, що для рослин малини, які вирощували на модифікованих живильних середовищах, характерним є збільшення активності ферментів: в 3–4 рази поліфенолоксидази та в 4–5 разів - пероксидази. Останній відноситься до групи поліфункціональних ензимів, які активізуються в присутності іонів заліза. З огляду на те, що в експерименті рослини вирощувалися на кислих середовищах (рН=5,0–5,5) особливу роль у ферментативному каталізі продуктів метаболізму в клітинах листків належала насамперед кислим пероксидазам, що знайшло підтвердження в експериментальних дослідженнях активності ферментів.

Важливою фізіологічною особливістю рослин малини, які були вирощені на модифікованих середовищах, є значне (в 3–4 рази порівняно зі стандартним безгормональним середовищем та в 4–5 разів відповідно до середовища, яке не містило ферум-хелатного комплексу) збільшення активності пероксидази. Цей фермент відноситься до групи поліфункціональних ензимів, які активізуються в присутності іонів заліза. У наших дослідженнях активність ферменту визначали в буферних розчинах (рН=4,7; 6,7; 7,3). З огляду на те, що в експерименті рослини

вирощувалися на слабкокислих середовищах (рН = 5,0–5,5) особлива роль у ферментативному каталізі продуктів метаболізму в клітинах, ймовірно, належала насамперед кислим пероксидазам. Це припущення знайшло своє підтвердження в експериментальних дослідженнях активності вільної і слабкозв'язаних форм пероксидази.

Враховуючи той факт, що пероксидаза відіграє важливу роль у окисненні ауксинів, а зв'язані з клітинними стінками пероксидази беруть участь у формуванні вторинних клітинних оболонок, вона виконує конституційну функцію. Активність ферменту та його ізоферментний склад мають прямий вплив на структурну організацію вегетативних органів рослин.

### 3.3. Оцінка успішності адаптації плодово–ягідних культур в умовах плантаційного вирощування за комплексом біохімічних показників

Для оцінки успішності адаптації плодово–ягідних культур в умовах плантаційного вирощування варто визначати вміст вторинних метаболітів у тканинах рослин малини звичайної (*Rubus idaeus*).

Для флавоноїдів характерним є поглинання в ультрафіолетовій та видимій частинах спектру (210–600 нм). Спектр поглинання флавоноїдної сполуки має, зазвичай, дві смуги: перша (I) – у довгохвильовій частині спектру (320–380 або 490–540 нм для антоціанидів), друга (II) – у короткохвильовій (210–290 нм). При проведенні спектрофотометричного аналізу виділених з листків малини фенольних сполук було показано, що за спектральними характеристиками поглинання ультрафіолетового світла виділяються чотири групи вторинних метаболітів: елагова кислота та елагітаніни (В); оксикоричні кислоти (С), флавоноїди (F) та (D) – конденсовані таніни, у тому числі проантоціанідіни (рис. 3.11). Положення смуг поглинання є характерною ознакою окремих груп флавоноїдів. Флаванони і флаваноноли відрізняються від інших флавоноїдів положенням II смуги в області 270–290 нм та наявністю I смуги у вигляді плеча за 310–330 нм. Специфічною ознакою флавонів і флавонолів є положення смуги I у області 320–355 и 340–385 нм відповідно (F) (рис. 3.12).

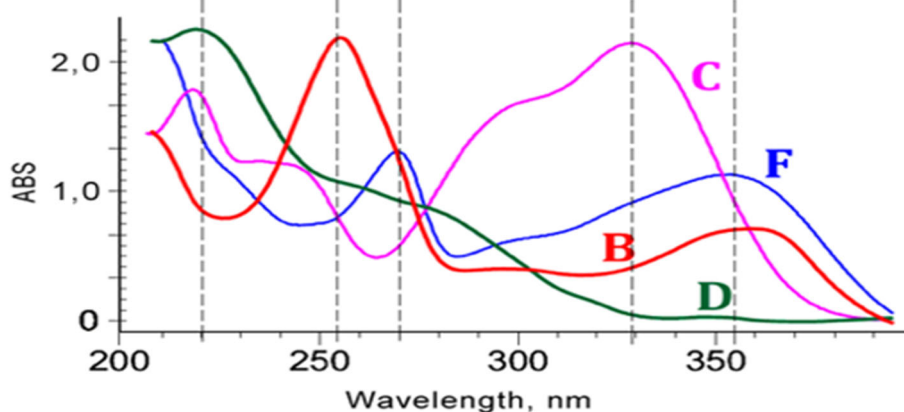


Рисунок 3.12. – Спектри поглинання фенольних сполук метанольних екстрактів листків *Rubus idaeus* (дика форма): В – елагова кислота та елагітаніни; С – оксикоричні кислоти; F – флавоноїди; D – конденсовані таніни

Серед основних фенольних компонентів у складі листків слід зазначити насамперед проантоціанідини (конденсовані таніни – димери катехіну й епікатехіну) та флавонол–глікозиди (диглікозидикверцетину й кемпферолу) (рис. 3.13–16). Додатково залишаються галотаніни, елагітаніни та оксикоричні кислоти, що узгоджується з літературними даними [12].

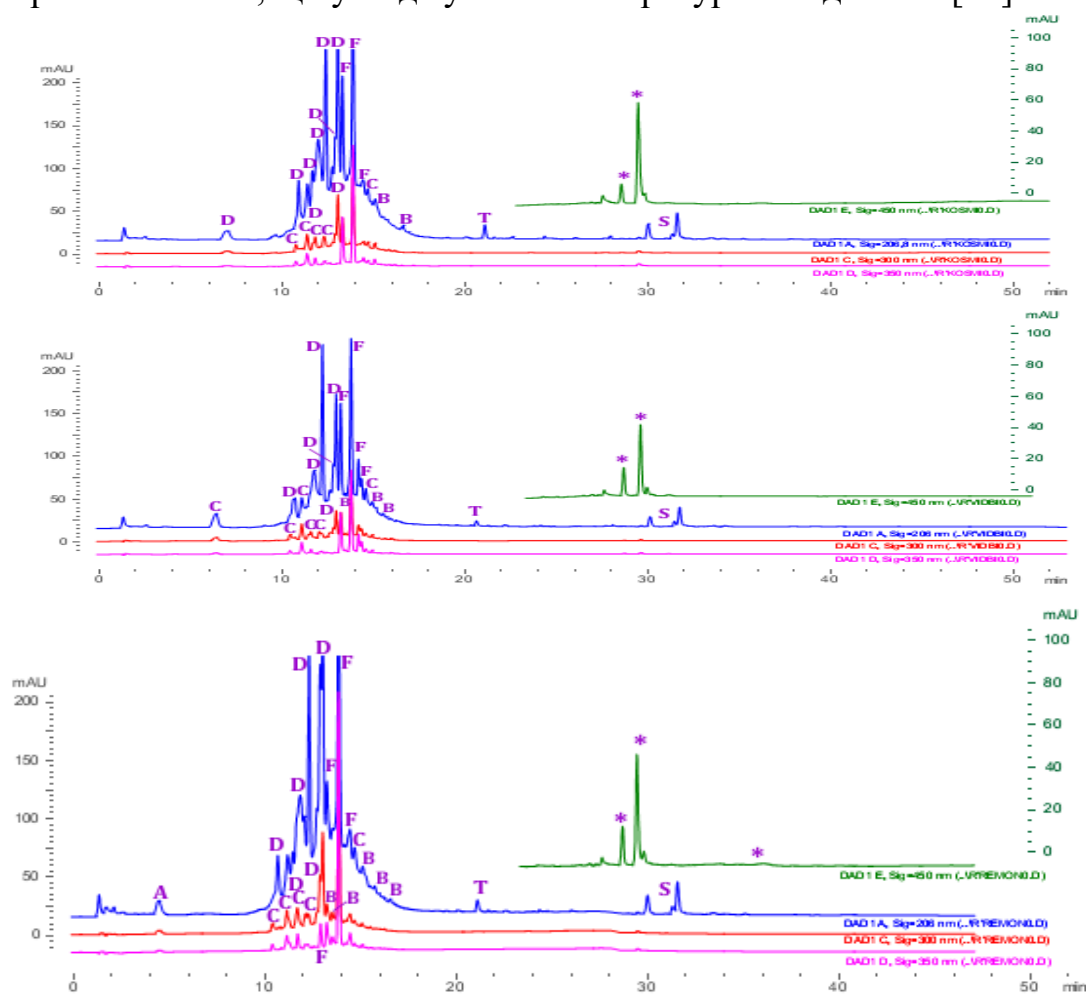
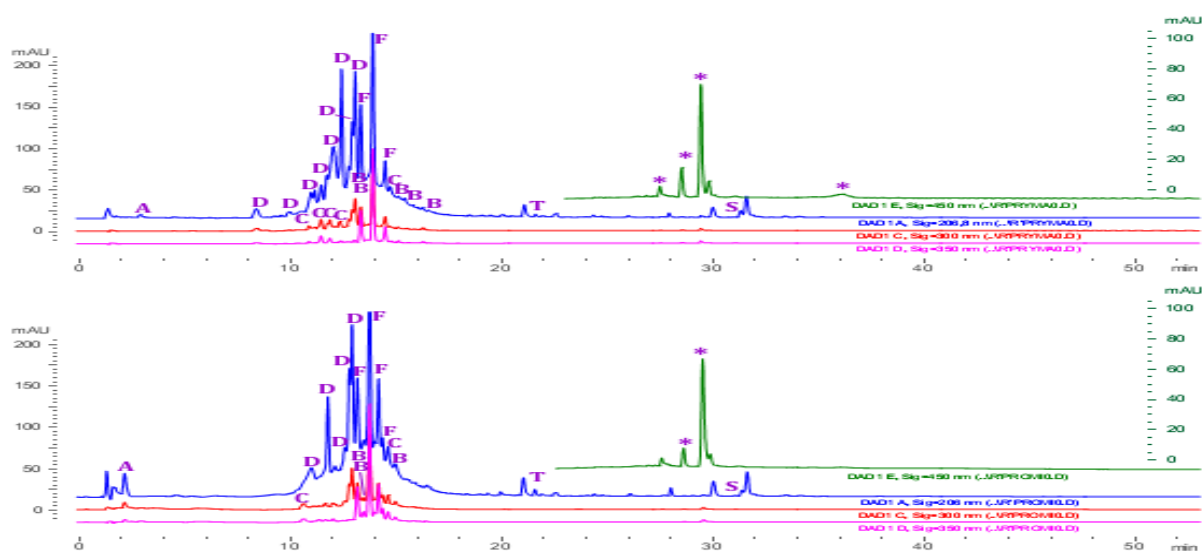


Рисунок 3.13. – Хроматографічні профілі екстрактів листків малини звичайної *Rubus idaeus*. Сортозразки зверху вниз: Космічна; Відбірна; Ремонтантна





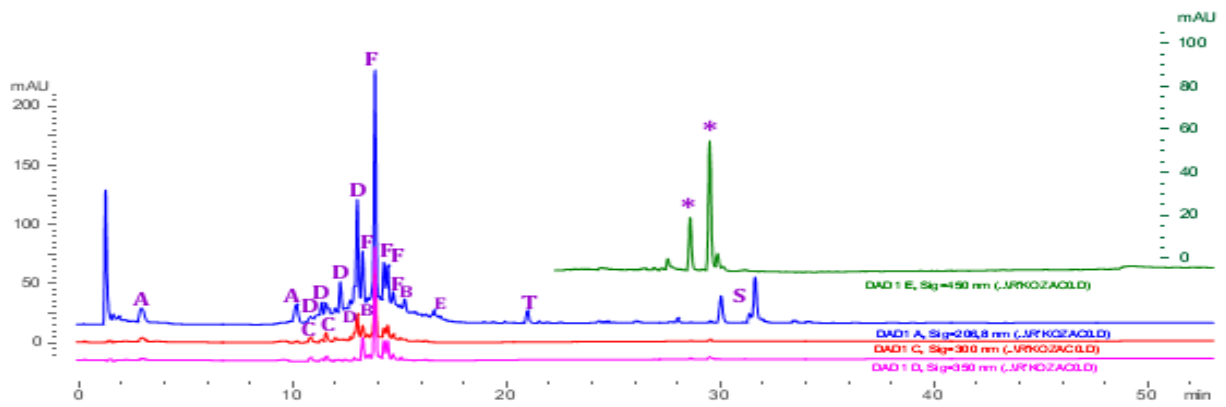


Рисунок 3.14. – Хроматографічні профілі екстрактів листків малини звичайної *Rubus idaeus*. Сортозразки зверху вниз: Примара; Промінь; Козачка

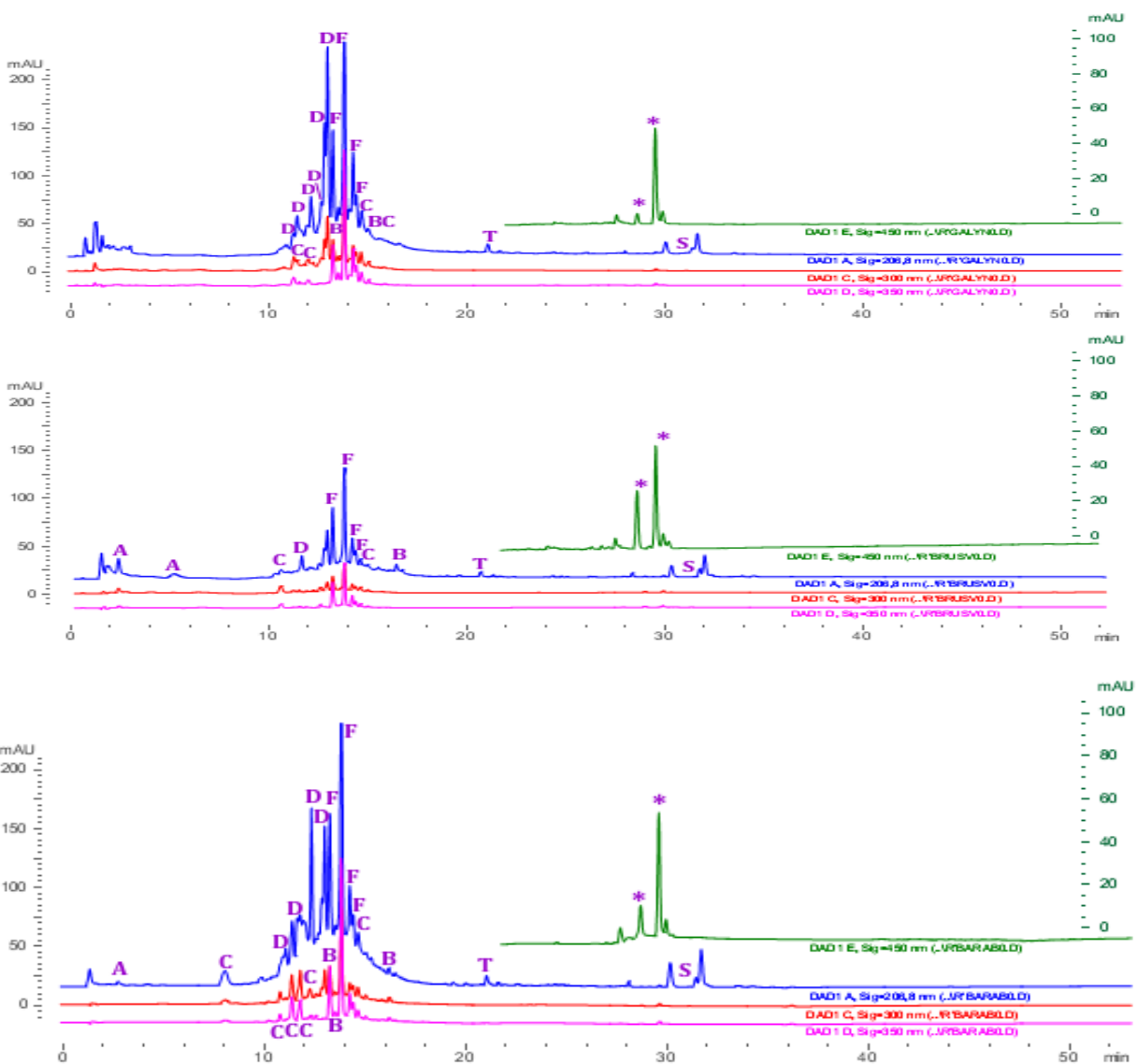


Рисунок 3.15. – Хроматографічні профілі екстрактів листків малини звичайної *Rubus idaeus*. Сортозразки зверху вниз: Галинка; Брусвяна; Барабашка

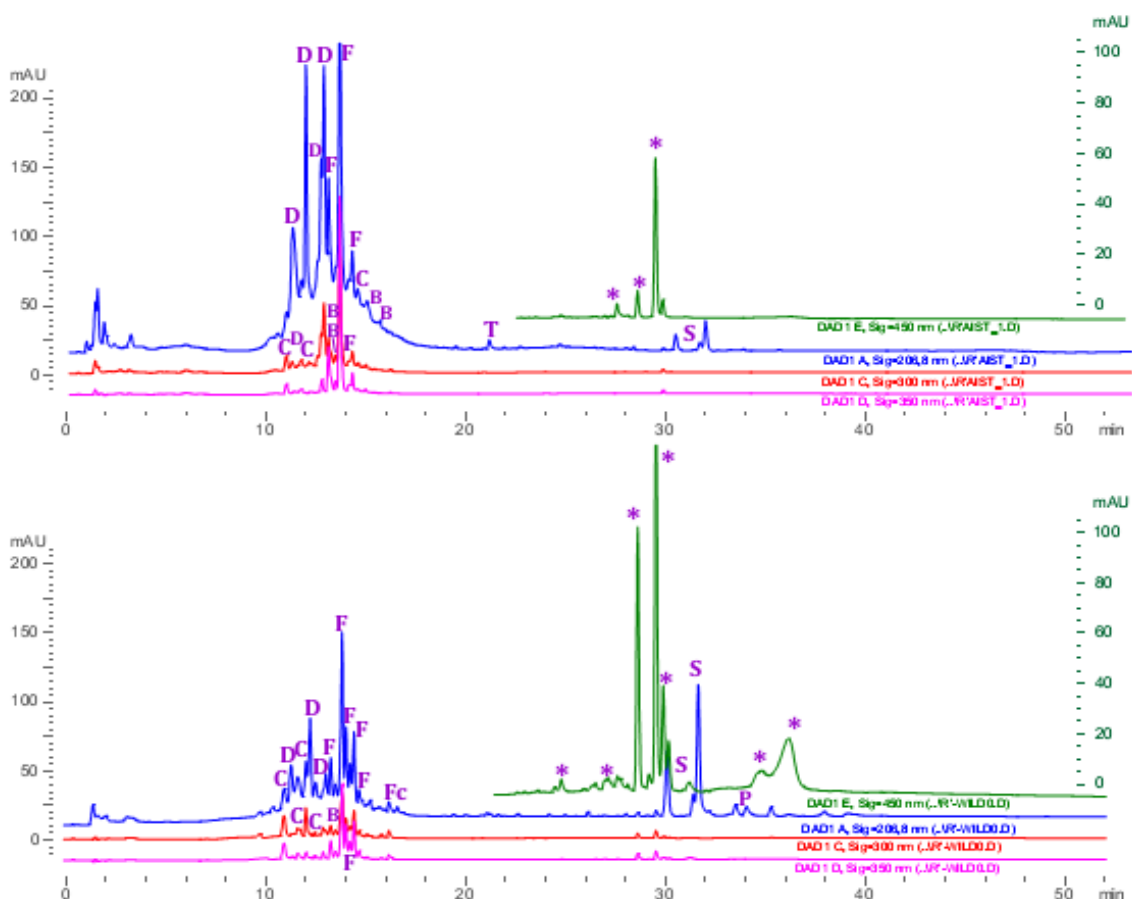


Рисунок 3.16. – Хроматографічні профілі екстрактів листків малини звичайної *Rubusidaeus*. Сортозразки зверху вниз: Херітедж; дика форма (*wild-type*)'

Зірочками позначені пігменти листків та їх деривати – хлорофіли, хлорофіліди, феофітини, феофорбіді, каротиноїди, ксантофіли тощо; умовні позначки: А – галова кислота та галати (галотаніни); С – оксикоричні кислоти (кавова, п-кумарова, ферулова) та їх кон'югати з винною, хінною, шикімовою кислотами (хлорогенові тощо), вуглеводами та амінами; В – елагова кислота та елагітаніни; D – конденсовані таніни (проантоціанідини); Е – інші таніни (похідні педункулагіну й сангвіїну); F – флавоноїди та їх глікозиди; G – аліфатичні кислоти та лактони; L – лігнани; М – оксibenзойні кислоти та їх деривати (саліцилова кислота, метилсаліцилат); N – нортерпеноїди та їх глікозиди; Т – ди- і тритерпеноїди та їх глікозиди (сапоніни); S – стерини та їх ефіри; Р – фосфоліпіди. Зірочками позначені пігменти листків та їх деривати – хлорофіли, хлорофіліди, феофітини, феофорбіді, каротиноїди, ксантофіли; зірочками позначені пігменти листків та їх деривати – хлорофіли, хлорофіліди, феофітини, феофорбіді, каротиноїди, ксантофіли тощо

За загальним фенольним пулом культивари досить чітко розподіляються на 3 групи (табл. 3.2, остання колонка). Дика форма виділяється набагато більшим вмістом пігментів, особливо каротиноїдів, котрі майже не реєструються в культиварах.

Таблиця 3.2

Відносний вміст основних вторинних метаболітів<sup>†</sup> та кількість речовин (верхній індекс)<sup>‡</sup> листків малини звичайної досліджуваних сортів

Сорти	Групи вторинних метаболітів							
	галат и та галот аніни	елагі танін и	оксико ричні кислот и та кон'юг ати	проанто цианіди ни (конденс овані таніни)	флавонол – глікозид и та похідні	терпеної ди та їх глікозид и	стерин и та їх глікози ди	всі групи фенольних сполук * *
	Позначення на хроматограмах							
	A	B	C	D	F	T	S	ABCDF
Космічна		+ <sup>2</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>8</sup>	+++ <sup>3</sup>	++ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>20</sup>
Відбірна		++ <sup>3</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>6</sup>	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	++ <sup>20</sup>
Улюблена Сича	++ <sup>1</sup>	+++ <sup>5</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>6</sup>	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>18</sup>
Примара	+ <sup>1</sup>	+++ <sup>5</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>8</sup>	+++ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	++ <sup>19</sup>
Промінь	++ <sup>1</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	+++ <sup>5</sup>	+++ <sup>4</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>18</sup>
Козачка	++ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	++ <sup>15</sup>
Галинка		++ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>6</sup>	++ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>18</sup>
Брусвяна	+ <sup>2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>16</sup>
Барабашка	+ <sup>1</sup>	++ <sup>3</sup>	++ <sup>5</sup>	++ <sup>4</sup>	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	++ <sup>16</sup>
Херітейдж		+++ <sup>4</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>4</sup>	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+++ <sup>16</sup>
<i>Rubus idaeus</i> (wild-type)		+ <sup>2</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>7</sup>		++ <sup>2</sup>	+ <sup>16</sup>

<sup>†</sup> 3-бальна шкала (+++ є наближеною оцінкою вмісту 1000 ppm і вище)

<sup>‡</sup> всього піків, що інтегруються за заданих параметрів, інтерпретується як «не менше»

\*\* сигнал 254nm для реєстрації більшості фенольних та інших ароматичних структур

Сформовані листки малини вже не містять значної кількості терпеноїдів, і їх метаболізм перемикається на збільшення фенольного пулу, вміст якого порівняно з періодом формування листків підвищується в кілька разів. Проте

деякі сорти (Брусвяна, Козачка), як і дика форма, не накопичують значної кількості фенолів (табл. 3.2).

На основі комплексного молекулярно-генетичного і фізіолого-біохімічного аналізів перспективних сортів малини української селекції (селекціонери П.З. Шеренговий, В.П. Шеренговий, Ю.Ю. Андрусик) було виділено молекулярно-генетичні маркери деяких важливих ознак фенотипу рослин. За допомогою поліморфізму спектрів ампліфікації RAPD-PCR та ISSR-PCR вдалось виявити обумовлені генотипом ділянки геному, які пов'язані з певними морфотипами: відсутність шипів (сорта Космічний і Сяйво), здатність рослин до формування ремонтантних штаббових кущів (сорта Козачка і Благородна). Аналогічні результати показав кластерний аналіз сортів малини за комплексом фенольних сполук (рис. 3.17), у першу чергу флавоноїдів, оксикоричних кислот і конденсованих танінів. Високий показник спорідненості за біохімічним складом показали сорти Промінь і Галинка (сорт Галинка отримано шляхом схрещування сортів Сонце Києва і Промінь).

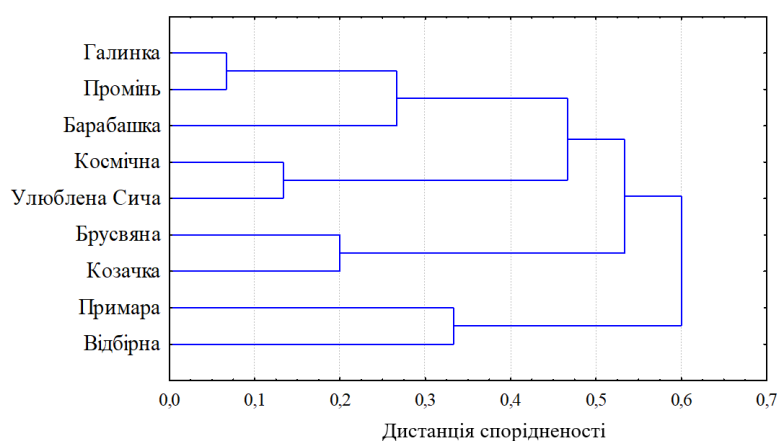


Рисунок 3.17. Дендрограма біохімічної тотожності сортів малини, побудована за поліморфізмом якісного складу фенольних сполук у листках

Дендрограма біохімічної тотожності досліджених сортів малини української селекції складалася з двох основних кластерів. До першого входили сім сортів: Промінь, Галинка, Барабашка, Космічна і Улюблена Сича, Брусвяна і Козачка (кластер Іа), до другого – Відбірна і Примара (кластер Іб).

За зменшенням рівня розбіжності складу фенольних комплексів у листках кластер Іа розкладався на два підкластери (Іа і Іб), у яких сорти об'єднувались у дві групи. Перша (Іа) представлена сортами Промінь, Галинка, Барабашка. За коефіцієнтом розбіжності найтотожнішими з них були сорти Промінь і Галинка ( $IP=0,06$ ). Їх створили через схрещення сортів Новокитаївська, Сонце Києва і Благородна (рис. 3.18). Від другого кластеру відокремився підкластер Іб, до якого увійшли сорти Улюблена Сича і Космічна ( $IP=0,14$ ). Останній отримано через схрещування сорту Англійська ремонтантна з сумішшю пилку сортів малини Благородна і Осіння.

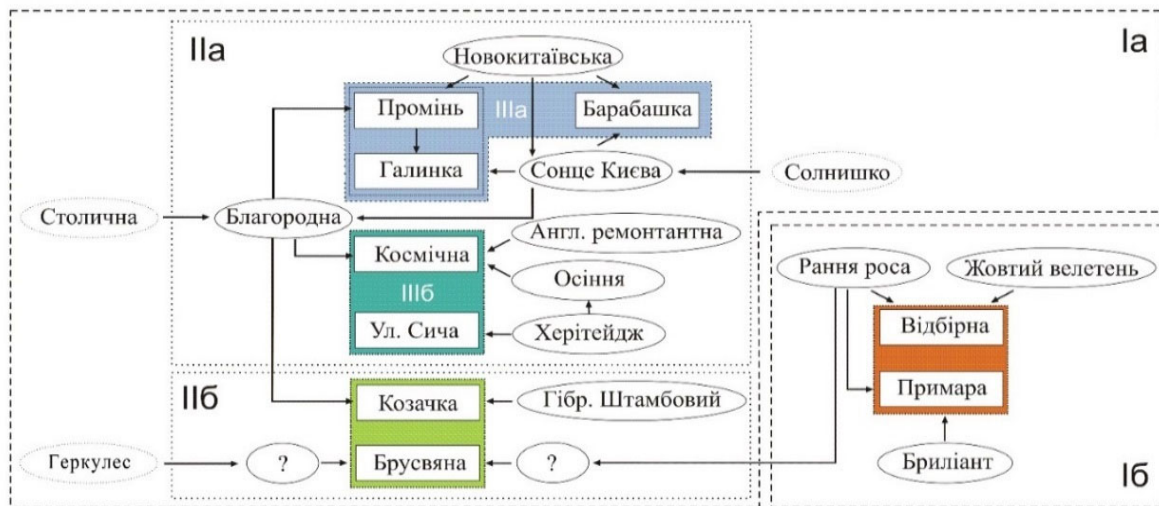


Рисунок 3.18. Генетичний зв'язок між кластерами біохімічної тотожності сортів малини української селекції і селекційним

Сорт Улюблена Сича отримано вільним запиленням сіянців малини ремонтантного сорту Херітейдж. За складом фенольних комплексів досить близькими виявились сорти Козачка (отриманий схрещуванням Благородної з гібридом Штамбовий) та Брусвяна (дані щодо вихідного селекційного матеріалу відсутні). За нашими даними ці сорти накопичують у листках найменшу кількість фенольних сполук і містять найнижчий пул саліцилової кислоти. Проте нами встановлено, що у малини сорту Брусвяна на стадії адаптації рослин–регенерантів після культури *in vitro* в листках значно збільшується вміст метильованої форми саліцилової кислоти – метилсаліцилату. Ця сполука летюча, ліпофільна і тому легко долає клітинні бар'єри та виконує сигнальну функцію у запуску каскадних механізмів формування індукованої стійкості рослин до патогенів. Окрім того, в умовах *in vitro* у рослин сорту Брусвяна значно збільшувався вміст терпеноїдів і стеринів, які цінуються за свої фармакологічні властивості.

За комплексом фенольних сполук серед досліджених нами сортів малини окремою групою від основної виокремлюються сорти Відбірна і Примара (кластер Ib), які отримані через схрещування сорту Рання Роса з Жовтим Велетнем (Сорт Відбірна) та з Бриліантом (сорт Примара). Ці сорти накопичують у листках значну кількість оксикоричних кислот, проантоціанідинів і флавоноїдів.

Для оцінки успішності адаптації плодово–ягідних культур в умовах плантаційного вирощування проводилась перевірка біохімічних показників за вмістом вторинних метаболітів у клітинах рослин смородини чорної (*Ribes nigrum L.*) (рис. 3.19). Смородина чорна – багаторічний ягідний кущ що відноситься до родини агрусових, до 1,5 м заввишки. Має опущені жовтуватосірі пагони, які до кінця літа стають коричневими. Листя почергове, черешкове, трьох-, п'ятилопате, зверху голе, знизу – із золотистими

залозами по прожилках, з ароматним специфічним запахом, шириною до 12 см. Квітки завдовжки 7-9 мм, лілові або рожево-сірі, п'ятипелюсткові, зібрані по 5 – 10 в пониклі китички довжиною 3-8 см. Плід – багатонасінна чорна або темно-фіолетова запашна кругла блискуча ягода діаметром 7-10 мм [2].



Рисунок 3.19. Смородина чорна (*Ribes nigrum* L.)

На підставі хроматографічного аналізу за характерною флюоресценцією в ультрафіолетовому світлі до та після обробки проявлюючими реактивами і величинами  $R_f$  у досліджуваних зразках встановлено наявність флавоноїдів, кумаринів та гідроксикоричних кислот. Аналіз якісного вмісту фенольних сполук у досліджуваних сортів смородини дозволив визначити суттєві відмінності у їх складі. Сорти української селекції характеризуються наявністю флавоноїдів з характерними для них властивостями поглинати ультрафіолетове світло у діапазоні 320–360 нм, про що свідчать темно-коричневі плями на хроматограмі, які після обробки розчином хромогенних реактивів (хлорид алюмінію, гідроксид натрію, дифенілборил оксиетиламін) інтенсивно світяться після їх збудження ультрафіолетом (365 нм).

Фотоденситометричний аналіз хроматограм показав, що найбільший вміст фенольних речовин властивий сортам Яринка, Пам'ятна і Мрія Київська 5, які містять найбільшу кількість сполук, ідентифікованих як флавоноїди.

Після обробки хроматограм хлоридом алюмінію було виявлено речовини в діапазоні  $R_f$  від 0,48 до 0,75, які набули інтенсивного синьо-зеленого забарвлення. В екстрактах листків смородини чорної виявлено речовину з показником  $R_f$  0,48, яка ідентифікується як глікозид кверцетину (рутин) і співпадає зі свідком на хроматограмі. Найбільший вміст рутину, за нашими даними, мали листки сортів Яринка та Мрія Київська 5. Сорт Пам'ятна, порівняно з попередніми, відзначався меншим вмістом флавоноїду, а в листках сорту Лелека цю речовину не визначено.

Плями на хроматограмах, які мали синю флуоресценцію до обробки хромогенними реактивами за електронними спектрами ідентифіковані, як



гідроксикоричні кислоти та кумарини. Зокрема, сорти Яринка та Пам'ятна відзначаються високим вмістом цих сполук, порівняно з іншими, про що свідчить інтенсивність світіння фенольних сполук до і після обробки реактивом. Порівняльна характеристика фотоденситограм флавоноїдів показала, що значення Rf, які відповідають окремим речовинам у цих сортів значно відрізняються. Світіння хімічної сполуки з показником Rf 0,7 у сорту Яринка було у 4,5 разів інтенсивнішим, ніж у сорту Лелека. Встановлено, що у сорту Мрія Київська 5 вміст речовини з Rf 0,24 був у 2,5 рази більшим, ніж у сорту Яринка, а у Пам'ятної та Лелеки ця сполука не виявлена. Отже, найінтенсивніші піки, що відповідають зонам адсорбції флавоноїдів, зафіксовані у сортів Яринка та Мрія Київська 5.

У таблиці 3.3. наведено дані по загальному вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у листках смородини. У межах даної групи виділяються сорти з різним рівнем їхнього накопичення. Встановлено, що високим вмістом фенольних сполук вирізняються сорти Мрія Київська 5 (31,8 мг/г) та Лелека (25,7 мг/г). Загальний вміст флавоноїдів у листках має несуттєву різницю. Мінімальна кількість цих речовин міститься в листках сорту Яринка – 1,4 мг/г, максимальний – 2,8 мг/г визначено в листках сорту Пам'ятна.

Таблиця 3.3

Загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів у листках чорної смородини після культури *in vitro*, мг/г

Сорт	Вміст фенолів	Вміст флавоноїдів
Лелека	25,7 ±0,11	2,6 ±0,06
Пам'ятна	19,2 ±0,08	2,8 ±0,09
Мрія Київська 5	31,8 ±0,03	1,8 ±0,03
Яринка	17,6 ±0,31	1,4 ±0,02

Отже, по загальному вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у листках смородини чорної досліджувані сорти за порядком зростання можна розташувати наступним чином: Мрія Київська 5 > Лелека > Пам'ятна > Яринка. Водночас сорти Лелека та Мрія Київська 5 відзначаються найвищим вмістом фенолів, а сорти Пам'ятна та Лелека – найвищим вмістом флавоноїдів. Оскільки флавоноїди виконують протекторну функцію у тканинах рослин [7] у поєднанні з деякими пігментами – ксантофілами, каротиноїдами – вони здатні посилювати адаптогенну систему рослинного організму [6], виявляючи тісний зв'язок між їх вмістом у листках рослин і стійкістю до грибних захворювань.

Для п'яти сортів чорної смородини, до яких було застосовано біохімічне профілювання (Лелека, Пам'ятна, Яринка, Мрія Київська 5 і Радужна) на наявність у листках продуктів фенілпропаноїдного синтезу та флавоноїдів,

виявлено три групи сортів, або кластерів. Кластерний аналіз довів, що до першої тісно зв'язаної групи входило чотири сорти: Лелека, Пам'ятна, Яринка і Мрія Київська 5 (рис. 3.20).

Останній, з досліджуваних нами, сорт Радужна, за біохімічним профілем був значно віддаленим від основної групи і входив у окремий кластер. Цей сорт було отримано в інституті садівництва НААН України. Слід зазначити, що при збільшенні значущості рівня міжсорткових зв'язків перший кластер розкладається на два підкластери, до яких входять сорти Лелека і Пам'ятна, Яринка і Мрія Київська 5. Найтісніші зв'язки за біохімічними сполуками (індекс розбіжності – 1,4) визначились для першої пари сортів, для другої вони були дещо нижчими (2,0). Отримані нами результати вкладаються у логіку селекційного процесу і пояснюється відбором батьківських форм, які були обрані для створення досліджуваних сортів.

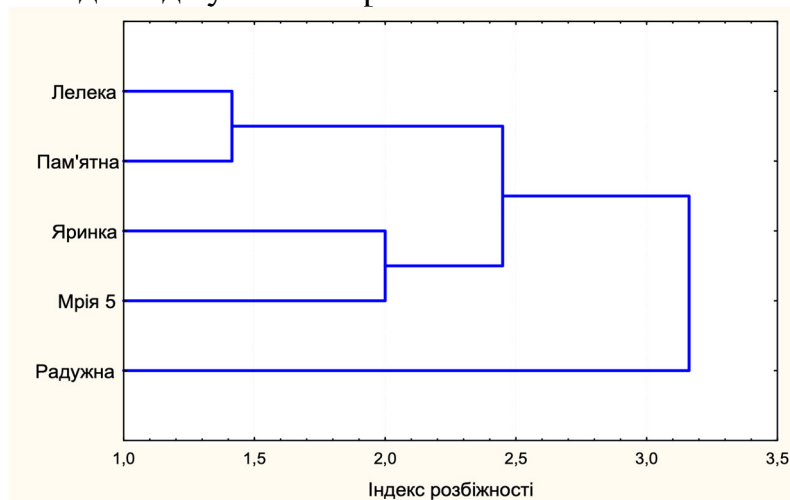


Рисунок 3.20. Дендрограма зв'язків за якісним складом фенольних сполук між сортами чорної смородини української селекції

Кластеризація сортів співпала з даними аналізу головних компонент (АГК), який також було проведено за якісним складом фенольних сполук у листках чорної смородини (рис. 3.21).

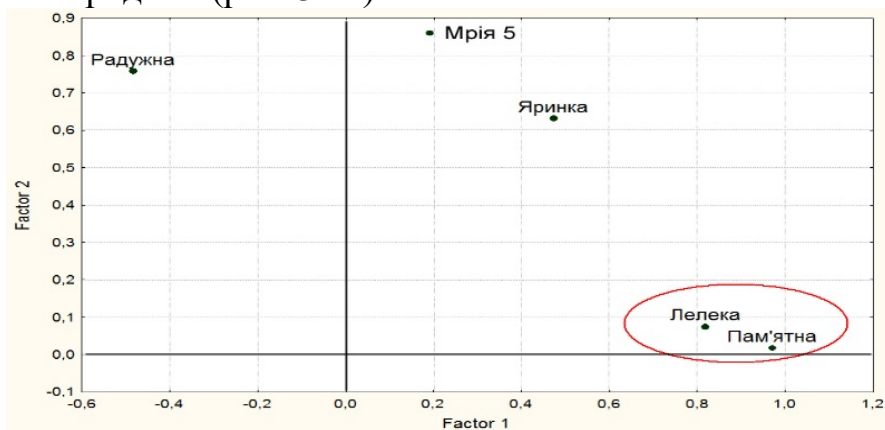


Рисунок 3.21. Проекції сортів смородини в координатах осей головних компонент за результатами аналізу матриці якісного складу фенольних сполук

У проєкціях координат головних компонент досліджувані сорти розташовані таким чином, що чітко відзеркалює генетичні зв'язки з батьківськими формами, які були використані в селекційному процесі. Так, для створення і сорту Лелека, і сорту Пам'ятна селекціонери обрали сорт смородини чорної Народна, його схрещували з сортом Голосіївська – в результаті отримали сорт Пам'ятна і Мрія Києва (сіянець сорту Голубка) – отримали сорт Лелека. Остання батьківська форма була використана і для створення сорту Яринка, яка в площині координат двох факторів розташована ближче до сорту Лелека. Дистальніше від основної групи сортів знаходиться сорт Мрія Київська 5, і це можна пояснити тим, що цей сорт – міянець, отриманий від вільного запилення сорту Ювілейна Копаня. Усі вище згадані сорти – результат селекційної роботи кафедри садівництва на чолі з П.З. Шеренговим. У окремому проєкційному полі на графіку розташований сорт Радужна. Він був отриманий від сортів Титанія (Швеція) і Пам'ять Вавилова (Білорусь) (рис. 3.22).

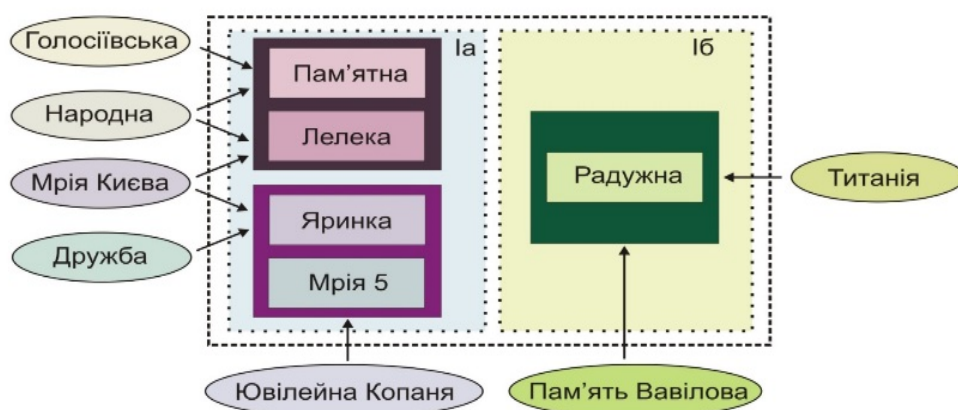


Рисунок 3.22. Генетичні зв'язки між кластерами біохімічної тотожності сортів смородини чорної (українська селекція) і батьківськими формами: кластер Ia – сорти кафедри садівництва НУБіП України, Ib – Інституту садівництва НААН України

Слід зазначити, що аналогічні результати, які підтверджують тісний зв'язок між якісним складом фенольних сполук у листках і успадкованими в процесі селекції ознаками рослин, за якими проводиться ідентифікація сортів (форма та розміри куща, ягоди, стиглість, стійкість, біохімічний склад плодів тощо), були нами отримані при досліджуванні сортів малини звичайної.

Таким чином, можна стверджувати, що у досліджуваних сортів смородини чорної, як і у малини звичайної, синтез вторинних метаболітів фенольної природи тісно зв'язаний з іншими біохімічними процесами, які регулюють важливі фізіологічні процеси, відповідальні за ріст і розвиток рослин. Факти тісного зв'язку між біохімічним складом фенольних сполук і фенотипами рослин підтверджують теоретичне припущення щодо регуляторної ролі вторинних метаболітів у процесах формування комплексу пристосувальних реакцій рослинного організму.

У процесі мікроклонального розмноження в листках рослин малини сорту Брусвяна, для якої за сортоспецифічними властивостями не характерно накопичення фенольних сполук, загальний пул фенолів дещо збільшується, а в процесі адаптації до умов відкритого ґрунту поступово зменшується (табл. 3.4), що викриває особливе значення продуктів фенілпропаноїдного синтезу і флавоноїдів у процесах молекулярної репарації та оздоровлення рослинного організму на стадіях відновлення систем і органів у посттравматичний період.

Таблиця 3.4

Особливості накопичення фенольних сполук у листках малини сорту Брусвяна (мг/г сирої маси) в залежності від способів розмноження і культивування рослин

Спосіб розмноження	Умови культивування	феноли, мг/г	флавоноїди, мг/г	феноли/ флавоноїди
живцюванням	відкритий ґрунт	32,0 ±0,96	4,7 ±0,13	6,8
<i>in vitro</i>	закритий ґрунт	58,1 ±1,74	3,7 ±0,11	15,7
	відкритий ґрунт	46,8 ±1,40	3,4 ±0,10	13,8

Таким чином, на основі проведеного нами біохімічного аналізу сортів малини української селекції показано, що вторинні метаболіти фенольної природи, їх якісний і кількісний склад скорельовані з іншими біохімічними і морфо–фізіологічними ознаками, які покладені до критеріїв ідентифікації сортів. Факти тісного зв'язку між біохімічним складом фенольних сполук і фенотиповими ознаками рослин підтверджують положення щодо регуляторної ролі вторинних метаболітів у процесах формування комплексу пристосувальних реакцій рослинного організму до навколишнього середовища. За однакових умов вирощування і фенофаз рослин малини якісний склад фенольних сполук у листках виявляється високоінформативним показником загального стану та походження сортів.

### 3.4. Дослідження комплексу пластидних пігментів у листках малини звичайної

*Порівняльна оцінка синтезу пігментів і вторинних метаболітів у тканинах рослин малини за різних умов їх вирощування.*

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках досліджуваних сортів малини визначали за загальноприйнятою методикою на спектрофотометрі Optizen POP (Південна Корея). Пігменти екстрагували ацетоном або метанолом. Вміст хлорофілу (Хл) *a* і Хл *b* у рослинах визначали за довжинами хвиль 644 і 662 нм, каротиноїдів (к) – 440 і 644 нм. Концентрацію (С) пігментів перераховували у мг на г сирої маси листків за формулами:

$$C_a = 9,78 * D_{662} - 0,99 * D_{644}$$

$$C_b = 21,43 * D_{644} - 4,65 * D_{662}$$

$$C_a + C_b = 5,13 * D_{662} + 20,44 * D_{644}$$

$$C_k = 4,7 * D_{440} - (1,38 * D_{662} + 5,48 * D_{644})$$

де:  $C_a$  – концентрація Хл  $a$ ,  $C_b$  – концентрація Хл  $b$ ,  $C_k$  – концентрація каротиноїдів,  $D_{440}$  – оптична щільність суміші за довжини хвилі 440 нм,  $D_{662}$  – оптична густина екстракту за довжини хвилі 662 нм,  $D_{644}$  – оптична густина екстракту за довжини хвилі 644 нм.

Визначення вмісту хлорофілів і каротиноїдів у листках досліджуваних сортів малини та розрахунок індексів співвідношення виявили фізіологічні та екологічні залежності цих показників від умов культивування рослин. Для екстрактів листків малини сорту Брусвяна максимальне поглинання світла у метанолі було у спектральних частотах, які характерні для хлорофілів (нм): 665, 435 (рис. 3.23).

Важливим показником ефективності роботи асиміляційного апарату рослин, їх здатності акумулювати продукти первинного метаболізму є вміст у листках пластидних пігментів (хлорофілу  $a$  і  $b$ ). За результатами наших досліджень було з'ясовано, що у саджанців після культури *in vitro* вміст хлорофілу  $a$ , порівняно з багаторічними рослинами дослідних ділянок, удвічі менший. Низький вміст хлорофілу обумовлений режимом культивування рослин–регенерантів *in vitro* та поступовістю формування асиміляційного апарату.

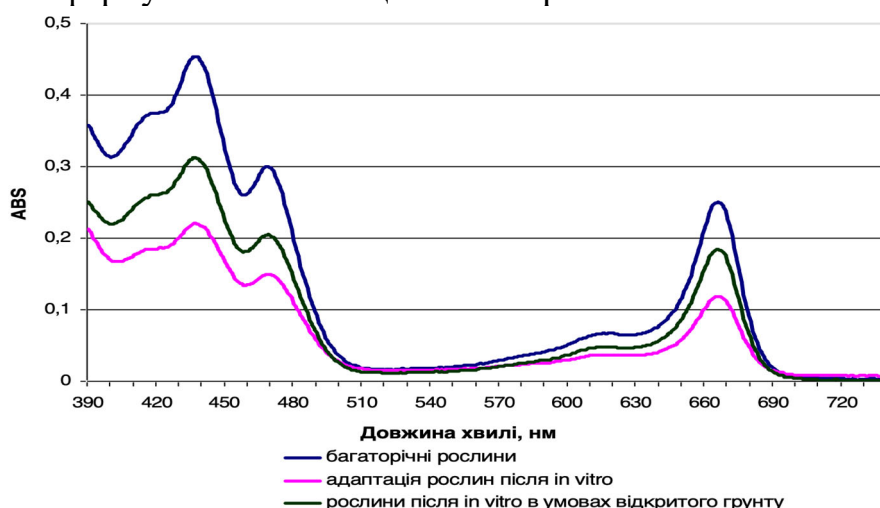


Рисунок 3.23. Спектри поглинання метанольних екстрактів листків рослин малини сорту Брусвяна, за різних умов культивування

Спектральний склад світла, у якому повністю відсутній ультрафіолет, міксотрофне живлення на збалансованих живильних середовищах і майже 100% вологість не сприяє синтезу фотосинтетичних пігментів. Після перенесення регенерантів їх у ґрунтові суміші спектральний склад світла дещо змінюється, він доповнюється розсіяним ультрафіолетом випромінюванням, яке спочатку індукує синтез фотозахисних пігментів: антоціанів, каротиноїдів та ксантофілів, які створюють передумови для нормального функціонування хлоропластів. У нових умовах живлення рослин, газового середовища, вологості і оптичних характеристик рослинні організми поступово

трансформуються. Створюються нові конституційні ознаки: потовщена кутикула, високий вміст захисних пігментів і вторинних метаболітів, які володіють антиоксидантними властивостями. Сума хлорофілів за подальшою адаптацією рослин до умов тепличного комплексу збільшується у 1,5–1,6 рази, переважно за рахунок хлорофілу а (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст (мг/г) і співвідношення пігментів у листках малини сорту Брусвяна на початку вегетації

Пігментний комплекс	Багаторічні рослини	Рослини–регенеранти після <i>in vitro</i>	
	Умови відкритого ґрунту	Адаптація до ґрунтових субстратів	Адаптація до тепличних умов
Хл а	2,2 ±0,07	1,0 ±0,04	1,6 ±0,04
Хл b	0,8 ±0,02	0,5 ±0,01	0,6 ±0,02
Хл а/b	2,7 ±0,08	2,2 ±0,07	2,7 ±0,08
Хл а+b	3,0 ±0,09	1,5 ±0,04	2,2 ±0,09
с+ x	1,3 ±0,05	0,6 ±0,02	0,8 ±0,03
Хл а+b/c+ x	2,4 ±0,08	2,5 ±0,07	2,7 ±0,09

Співвідношення вмісту зелених пігментів (Хл а/Хл b) (рис. 3.24) найменше у рослин, які проходять адаптацію після пересаджування розсади у відкритий ґрунт (2,3) і найбільше – у багаторічних рослин (2,8), які перебувають у стані відносної вегетаційної стабільності (табл. 3.6).

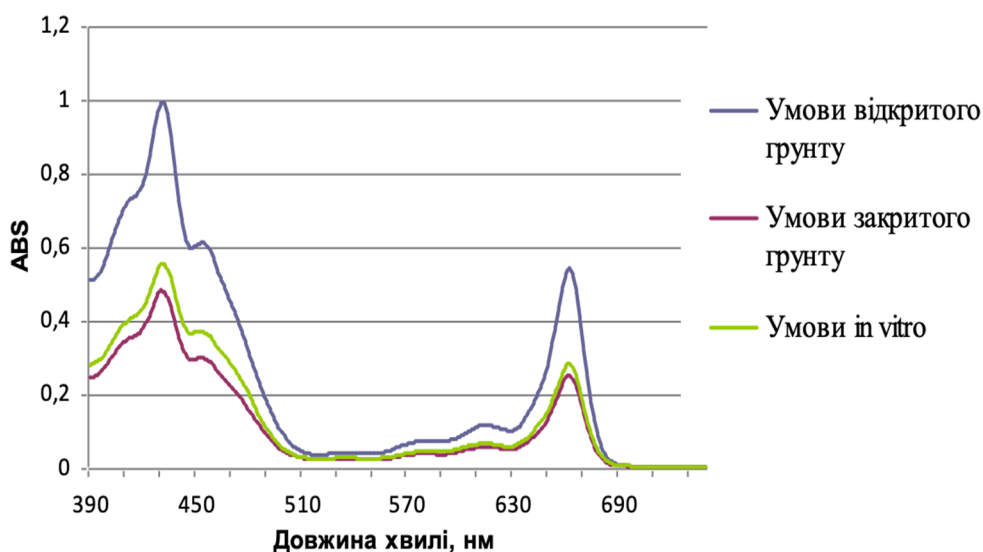


Рисунок 3.24. Спектри поглинання метанольних екстрактів листків малини сорту Брусвяна у після адаптаційний період



Цей показник характеризує збалансованість та ефективність роботи фотосистеми. Зменшення показника співвідношення хлорофілів пов'язано зі збільшенням світлозбирального Хл *b*, який є допоміжним пігментом, що інтенсивно синтезується за умов недостатнього освітлення або абіотичного стресу.

Таблиця 3.6

Вміст (мг/г) та співвідношення пігментів у листках малини сорту Брусвяна

Пігментний комплекс	Багаторічні рослини	Рослини–регенеранти після <i>in vitro</i>	
	Умови відкритого ґрунту	Адаптація рослин до тепличних умов	Адаптація до умов відкритого ґрунту
Хл а	5,1 ±0,15	2,4 ±0,07	2,7 ±0,11
Хл б	1,9 ±0,06	0,9 ±0,03	1,2 ±0,05
Хл а/б	2,8 ±0,08	2,6 ±0,08	2,3 ±0,09
Хл а + б	7,0 ±0,14	3,3 ±0,10	3,9 ±0,16
с + х*	1,5 ±0,05	0,8 ±0,04	1,0 ±0,05
Хл а + б/с + х	4,5 ±0,15	4,3 ±0,16	3,9 ±0,15

\*с + х – сума каротиноїдів

Загальний вміст хлорофілів і каротиноїдів найбільший у багаторічних рослин. Концентрація останніх у сирій масі листків середньої частини пагонів майже удвічі більша за листки рослин–регенерантів, які вирощуються в умовах тепличного комплексу (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Вміст та співвідношення пігментів у листках малини сорту Брусвяна

Сорт	Вміст пігментів, мг/г				Співвідношення пігментів	
	Хл а	Хл б	Хл а/б	с+х *	Хл а+б	Хл а+б/с+х
Брусвяна I **	1,9 ±0,06	0,8 ±0,02	2,4 ±0,07	0,9 ±0,02	2,6 ±0,08	2,8 ±0,09
Брусвяна II***	1,5 ±0,05	0,6 ±0,02	2,5 ±0,07	0,7 ±0,02	2,1 ±0,06	2,9 ±0,09
Козачка	1,4 ±0,04	0,6 ±0,01	2,4 ±0,07	0,8 ±0,03	2,1 ±0,05	2,6 ±0,07
Космічна	1,1 ±0,04	0,5 ±0,02	1,9 ±0,06	0,5 ±0,02	1,6 ±0,04	3,1 ±0,09
Барабашка	1,3 ±0,05	0,5 ±0,02	2,6 ±0,08	0,7 ±0,03	1,9 ±0,06	2,7 ±0,07
Осінь	1,6 ±0,04	1,0 ±0,03	1,6 ±0,04	0,7 ±0,02	2,7 ±0,09	4,0 ±0,12
Херітейдж	1,6 ±0,06	0,7 ±0,03	2,4 ±0,07	0,7 ±0,02	2,2 ±0,08	3,0 ±0,09
Примара	1,0 ±0,05	0,5 ±0,02	2,0 ±0,06	0,6 ±0,02	1,6 ±0,05	2,8 ±0,08
Відбірна	1,2 ±0,04	0,6 ±0,02	2,0 ±0,06	0,7 ±0,02	1,9 ±0,06	2,8 ±0,09
Галинка	1,7 ±0,04	0,6 ±0,01	2,8 ±0,09	0,8 ±0,03	2,4 ±0,08	2,8 ±0,08
Промінь	1,5 ±0,05	0,5 ±0,02	2,8 ±0,08	0,8 ±0,04	2,0 ±0,05	2,6 ±0,07

\*с + х – сума каротиноїдів

\*\* Брусвяна I – багаторічні рослини в умовах дослідних ділянок

\*\*\* Брусвяна II – рослини, які отримані *in vitro* і адаптовані до умов відкритого ґрунту

Після висаджування рослин–регенерантів у відкритий ґрунт за 2 тижні кількість каротиноїдів зростає на 20 %. Вважається, що каротиноїди мають високу антиоксидантну активність та запобігають фоторуйнації пігментного комплексу, акумулюючи частину світлової енергії.

Проведення аналізу пігментного складу листків 10 сортів малини, які представлені в колекції НУБіП України показало, що рослини в однакових умовах вирощування за кількісними показниками вмісту хлорофілів розділяються на три групи: високий (від 2,4 до 2,7 мг/г) – Брусвяна, Осіння, Галинка, середній (від 2,0 до 2,3 мг/г) – Козачка, Промінь, Херітейдж і низький (від 1,6 до 1,9 мг/г) – Відбірна, Космічна, Примара, Барабашка.

Після культури *in vitro* рослини–регенеранти сорту Брусвяна, які вже пройшли адаптацію до умов відкритого ґрунту мали дещо знижений вміст хлорофілів а і b (2,1 мг/г). Пояснити даний факт можна тим, що рослини після культури *in vitro*.

### **3.5. Визначення вмісту антоціанів у плодах малини звичайної методом спектрофотометрії**

Антоціани – пігменти, що зумовлюють забарвлення квітів, плодів, листків від рожевого до темно–фіолетового кольору та володіють широким спектром біологічних властивостей (антиоксидантна, захищають рослини від дії УФ, низьких температур, є продуктами проміжних біохімічних реакцій, виконують функцію атрактантів тощо). Для кожного конкретного виду рослин якісний склад та кількісний вміст антоціанів дуже специфічний і залежить від сортових особливостей і умов вирощування.

Антоціани розрізняються за кількістю гідроксильних груп, природою і кількістю приєднаних до молекули цукрів, положенням глікозидування, хімічною природою та кількістю аліфатичних й ароматичних кислот. У плодах малини виявлено чотири основних антоціани, які є похідними ціанідина: ціанідин–3О–глюкозид, ціанідин–3О–рутинозид, ціанідин–3О–2–глюкозилрутинозид, ціанідин–3О–софорозид. Антоціани є сильними антиоксидантами і нейтралізують дію вільних радикалів, допомагають при порушеннях серцево–судинної діяльності, гальмують запальні процеси, активізують опір організму до канцерогенів.

Пігменти володіють високою чутливістю до зміни кислотності середовища: у сильнокислому середовищі забарвлення антоціанів яскраво–червоне, при збільшенні рН воно поступово переходить у темно–синє. Це пов'язано зі зміною структури аглікону, що входить до складу пігменту. Різниця в адсорбції при  $\lambda = 510$  нм та при рН 1,0 і 4,5 пропорційна вмісту антоціанів.

Саме на основі здатності змінювати свій колір в залежності від значення рН, розроблено один з найбільш відомих методів кількісного визначення антоціанів – метод рН–диференціальної спектрофотометрії по Giusti і Wrolstad (*M. Monica Giusti, Ronald E. Wrolstad, 2001*) за характерними спектрами поглинання, що знаходяться в діапазоні довжин хвиль  $\lambda = 490\text{--}700$  нм.

#### *Підготовка та проведення досліджень з визначення антоціанів*

Метод дозволяє точно і швидко проводити аналіз антоціанів в присутності інших компонентів з подібним або ідентичним спектром поглинання.

#### *Матеріали:*

0,025 М калій–хлоридний буфер, рН 1,0

0,4 М натрій–ацетатний буфер, рН 4,5

#### *Порядок визначення вмісту антоціанів у плодах*

1. Увімкнути спектрофотометр та залишити його прогріватися на 30 хв до проведення вимірювань.

2. Визначити відповідний коефіцієнт розведення (DF) для проби (наприклад, якщо 0,2 мл проби доводиться до об'єму 3 мл, то  $DF = 15$ ).

3. Підготувати калій–хлоридний і натрій–ацетатний буферні розчини з рН 1,0 і рН 4,5 відповідно.

4. Підготувати дві розведених проби: одну з калій–хлоридним буфером рН 1,0, іншу – з натрій–ацетатним буфером рН 4,5. Розведені проби витримувати протягом 15 хв.

5. За допомогою функції «Baseline» автоматично побудувати калібрувальну криву по дистильованій воді при всіх довжинах хвилі, які використовуються (510 нм, 700 нм).

6. Виміряти оптичну густину кожної проби при  $\lambda = 510$  нм та 700 нм, використовуючи для контролю дистильовану воду. Проби для вимірювання повинні бути прозорими і не містити осаду.

7. Розрахувати оптичну густину розведених зразків за формулою:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

8. Визначити концентрацію мономерних антоціанів у вихідних зразках, використовуючи формулу:

$$MA \text{ (мг/л)} = (A \cdot MW \cdot DF \cdot 1000) / E,$$

де MA – концентрація мономерних антоціанів,

MW – молекулярна маса ціанідин–3–глюкозиду (449,2),

DF – коефіцієнт розведення (15),

E – молярне поглинання ціанідин–3–глюкозиду (26900).

Примітка\* Концентрація мономерних антоціанів та молярне поглинання в цій формулі відповідають переважаючому пігменту (ціанідин–3О–глюкозид). У випадку, якщо показник E та якісний склад пігментів невідомий, можна розрахувати вміст по ціанідин–3О–глюкозиду, де  $MW = 449,2$  і  $E = 26900$ .

Для оцінки якісного складу та кількості антоціанів у плодах досліджували шість сортів малини української і іноземної селекції: Відбірна, Барабашка, Промінь, Галинка, Херітейдж, Брусвяна. Використовували властивість антоціанів змінювати забарвленість розчинів за різними показниками рН (рожевий у кислому і синій у лужному середовищах) та поглинати світло у спектральному діапазоні 460–550 нм.

Було визначено, що за якісним складом пігментів більш збалансованими були сорти Брусвяна і Барабашка, які містили чотири основні глікозиди ціанідина. Найбільший вміст антоціанів виявлено у сортів Брусвяна, Херітейдж і Барабашка (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Вміст антоціанів у плодах малини

Сорт	Конц* мг/100 г				
	Всього	Сyn Rut	Сyn Glu	Сyn 2 GluRut	Сyn Sopho
Відбірна	0	–	–	–	–
Барабашка	40,2	10,9	17,5	5,0	6,8
Промінь	19,3	–	14,6	–	4,7
Галинка	27,6	–	22,5	–	5,1
Херітейдж	41,8	–	22,3	–	19,5
Брусвяна	48,8	5,1	26,9	4,4	12,5
Брусвяна (після <i>in vitro</i> )	40,8	4,0	23,8	2,7	10,3

\* у перерахунку на ціанідин–3О–глюкозид

У рослин малини сорту Брусвяна, що вступили у генеративну фазу розвитку вже за чотири місяці після культури *in vitro* якісний склад і масова частка основних глікозидів ціанідину майже не змінювалась, проте загальна кількість фенольних сполук зменшувалась на 12–15% (рис. 3.25).



Рисунок 3.25. Плодоношення оздоровлених *in vitro* рослин–регенерантів малини сорту Брусвяна на четвертий місяць після культивування у ґрунті

Розрахункова врожайність таких рослин на дослідних ділянках становила у середньому 1,5–1,8 т/га. Очевидно, що плодоношення однорічних рослин не має комерційної привабливості, проте виявляє явище акселерації, яке відбувається внаслідок відновлення систем і органів, оздоровлення організму від латентних інфекцій та епіфітної мікобіоти.

Спектри поглинання спиртових екстрактів плодів малини, що містили антоціани, таніни та інші фенольні сполуки виявили максимуми за довжиною хвиль у діапазоні від 507 до 515 нм (рис. 3.26).

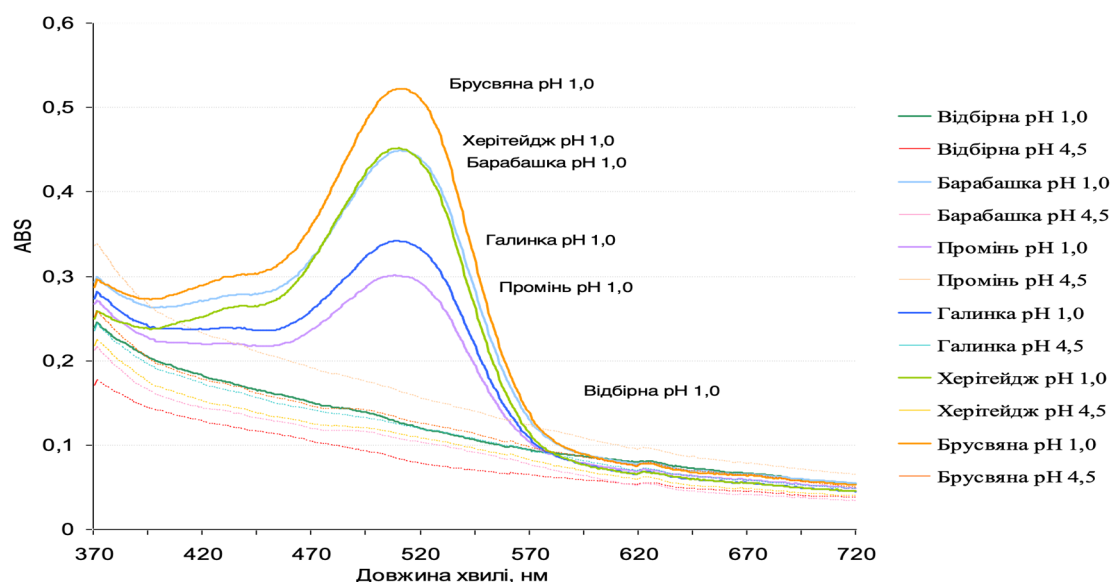


Рисунок 3.26. Спектри поглинання антоціанів у плодах малини різних сортів

Для проведення біохімічного профілювання спиртових екстрактів плодів малини методом тонкошарової хроматографії нами було підбрано систему розчинників: н-бутанол – оцтова кислота – мурашина кислота – вода (4 : 0,5 : 0,5 : 2), яка дозволяла достатньо чітко розділяти глікозиди ціанідину і дельфінідину. Розділення пігментного комплексу проводили на пластинках Сорбфил ПТСХ–П–А–УФ. За таких умов на хроматограмах виділяється до чотирьох плям з характерним для ціанідинів фіолетово-рожевим забарвленням (глікозиди ціанідину). Методом ТШХ показано, що домінуючими антоціанами у плодах малини досліджуваних сортів є ціанідин–3О–глюкозид ( $R_f$  0,59) і ціанідин–3О–софорозид ( $R_f$  0,72) (рис. 3.27).

Інші глікозиди ціанідину містились у меншій кількостях.

Встановлено, що показник  $R_f$  для ціанідин–3О–рутинозиду становив – 0,54, а ціанідин–3О–2–глюкозилрутинозиду – 0,66. У жовтоплідної малини сорту Відбірна антоціани нами не виявлені, проте це ніяк впливало на її товарний вигляд і смакові властивості. Це свідчить про те, що важливі для плодів малини лікувальні і профілактичні властивості можуть не збігатись з іншими характеристиками, у тому числі смаковими.

Сорт Відбірна, тим не менш, користується значною популярністю у споживачів за колір, приємний аромат і кислувато-солодкий смак.

Сорт Галинка на фоні незначного загального вмісту антоціанів характеризується високим вмістом ціанідин-3O-глюкозида, який вищий ніж у сортів Барабашка і Херітейдж.

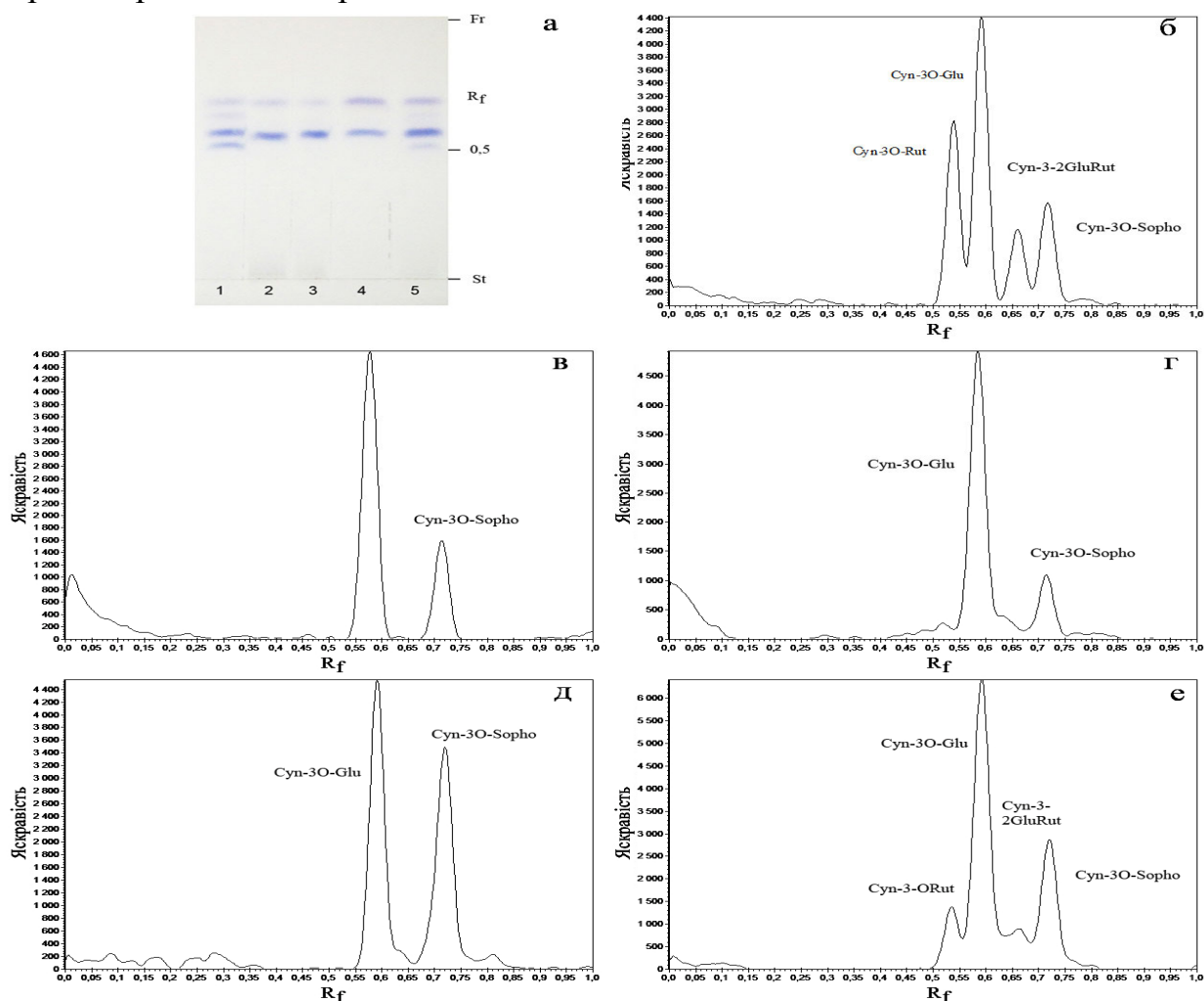


Рисунок 3.27. Хроматограма (а) і фотоденсітограми (б–д) антоціанів у плодах п'яти сортів малини: б – Барабашка, в – Промінь, г – Галинка, д – Херітейдж, е – Брусвяна

Водночас найкращі антиоксидантні властивості за вмістом антоціанів притаманні плодам сортів Барабашка і Брусвяна.

### 3.6. Визначення полімерних продуктів деградації антоціанів у плодах малини звичайної

Показники деградації антоціанів екстрактів плодів можуть бути отримані на основі значень оптичної густини проб, оброблених розчином бісульфіту натрію. Продуктом взаємодії антоціанів та бісульфіту натрію є безбарвна сульфокислота.

Полімеризовані комплекси антоціанів та дубильних речовин (танінів) стійкі до знебарвлення бісульфітом, тоді як реакція знебарвлення мономерних антоціанів протікає досить швидко.



Насиченість кольору визначається сумою оптичної густини при  $\lambda_{\text{vis-max}}$  та 420 нм. Співвідношення між оптичною густиною знебарвленої та забарвленої проб використовується для визначення відсотку полімеризованих комплексів. Співвідношення між вмістом мономерних антоціанів та їх загальною кількістю використовується для визначення індексу деградації.

*Методика визначення полімерних продуктів деградації антоціанів:*

*Реагенти та розчини:*

Для приготування розчину бісульфіту натрію або калію необхідно:

- розчинити 1 г метабісульфіту натрію або калію ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  або  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) у 5 мл  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- розчин повинен бути приготований в день проведення вимірювань, оскільки з часом здатний набувати жовтого відтінку, що здатне вплинути на якість вимірювань.

Для приготування 0,025 М калій–хлоридного буферу, рН 1,0 необхідно:

1,86 г  $\text{KCl}$  розчинити в 980 мл дистильованої води;

- значення рН довести до 1,0 розчином концентрованої  $\text{HCl}$ ;
- довести об'єм до 1 л дистильованою водою.

Приготування 0,4 М натрій–ацетатного буферу рН 4,5:

- наважку 54,43 г натрію ацетату розчинити в 960 мл дистильованої води;
- довести значення рН розчином концентрованої  $\text{HCl}$  до 4,5;
- довести об'єм до 1 л дистильованою водою.

Розчин бісульфіту натрію 0,025 М калій–хлоридний буфер, рН 1,0

1. Увімкнути спектрофотометр та залишити прогріватися на 30 хв до проведення вимірювань.

2. Визначити відповідний коефіцієнт розведення для проби (наприклад, якщо 0,2 мл проби доводиться до об'єму 3 мл, то  $DF = 15$ ).

3. За допомогою функції «Baseline» автоматично побудувати калібрувальну криву по дистильованій воді при всіх довжинах хвилі, які використовуються (420 нм,  $\lambda_{\text{vis-max}}$ , 700 нм).

4. Розвести зразки дистильованою водою з використанням коефіцієнта розведення.

5. У кожну кювету внести по 2,8 мл розведеної проби. Додати 0,2 мл розчину бісульфіту натрію в одну кювету та 0,2 мл. дистильованої води в іншу. Витримувати протягом 15 хв.

6. Виміряти оптичну густину обох проб при 420 нм,  $\lambda_{\text{vis-max}}$ , і 700 нм. Для контролю використовувати дистильовану воду. Всі вимірювання повинні проводитися в період з 15 хв (етап 4) та 1 год після приготування зразків.

7. Розрахувати насиченість кольору (IC) (проба з  $\text{dH}_2\text{O}$ ) наступним чином:

$$IC = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700 \text{ nm}})] * DF$$

де  $DF$  – коефіцієнт розведення

8. Обчислити полімерний колір (PC) знебарвленого зразка (з бісульфітом натрію) наступним чином:

$$PC = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700 \text{ nm}})] * DF$$

9. Обчислити відсоток РС, використовуючи формулу:

$$PC (\%) = (PC / IC) \times 100$$

Аналіз екстрактів плодів досліджуваних сортів малини показав, що найбільшим вмістом полімеризованих комплексів антоціанів та дубильних речовин характеризуються сорти Промінь (61,2 %) і Галинка (рис. 3.28).

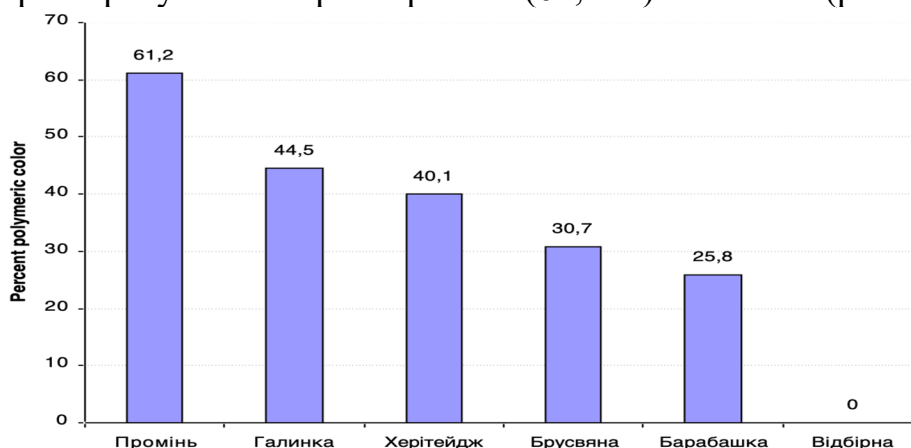


Рисунок 3.28. Деградація пігментів різних сортів малини під дією бісульфіту натрію

Слід зазначити, що нами не виявлено танінів у жовтоплідних плодах малини сорту Відбірна. Таким чином, цей сорт визначається не тільки мінорними кількостями антоціанів, але і їх полімеризованими формами. Це свідчить про те, що синтез цього класу фенольних сполук у репродуктивних органах блокується ще на стадії ферментативного перетворення дігідрофлавонолів (дігідрокемпферол і дігідрокверцетин) на антоціани за допомогою ферментів дегідрофлавонол–4–редуктази, антоціанідин синтази, антоціанідин–3–О глікозилтрансферази.

Найкращими показниками за накопиченням мономерних антоціанів і їх глікозидів володіють сорти Брусвяна і Барабашка, які містять у плодах 70 – 75 % глікозидів ціанідину. У цьому аспекті важливим є той факт, що саме ці сорти у антоціановому комплексі містять усі чотири основні глікозиди: ціанідин–3О–глюкозид, ціанідин–3О–рутинозид, ціанідин–3О–2–глюкозил–рутинозид, ціанідин–3О–софорозид, останній у відносно великій кількості міститься лише у сорту Брусвяна.

Таким чином, комплексні морфо–фізіологічні, анатомічні та біохімічні дослідження сортів малини української селекції підтверджують високу ефективність застосування біотехнологічних методів оздоровлення та мікроклонального розмноження рослин, які в процесі культивування *in vitro* та ступінчастої адаптації *in vivo* виявляють значний адаптаційний потенціал і високу продуктивність, що розкриває широку перспективу запровадження в Україні ягідництва на сучасному європейському рівні.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 3

1. Барабаш О.Ю., Леонтьєв О.М., Гонтар В.Т. Овочівництво і плодівництво: підручник. Київ: Вища школа, 2000. 503с.
2. Марковський В.С., Бахмат М.І. Ягідні культури в Україні. Кам'янець-Подільський: ПП «Медозбори-2006», 2008. 200 с
- Моисеев Д. В. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ. / Моисеев Д. В., Бузук Г. Н., Шелюто В. Л. Химико–фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 1. С. 35–38.
2. Шугалей И. В. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы. / Шугалей И. В., Гарабаджиу А. В., Илюшин М. А., Судариков А. М Экологическая химия. 2012. 21(3). С. 172–186/
3. Acar R., Ünver A., Arslan D., Özcan M., Güneş Ahmet. Effect of plant parts and harvest period on rutin, quercetin, total phenol contents and antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. Asian Journal of Chemistry, 2011. Vol. 23, № 7, P. 3240–3242.
4. Alcazar R., Marco F., Cuevas J. C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Altabella T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnology Letters. 2006. Vol. 28(23). P. 1867–1876. doi:10.1007/s10529-006-9179-3.
5. Alexeyeva A. A., Lykholat Y. V., Khromykh N. O., Kovalenko I. M., Boroday E. S. The impact of pollutants on the antioxidant protection of species of the genus *Tilia* at different developmental stages. Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія та екологія. 2016. Vol. 24(1). P.188–192.
6. Apati P., Houghton P. J., Kite G., Steventon G. B., Kery A. In-vitro effect of flavonoids from *S. canadensis* extract on glutathione S-transferase. JPP. 2006. Vol. 58. P. 251–256.
7. Broun P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. Current Opinion in Plant Biology. 2005. Vol. 8(3). P. 272–279.
8. Brown D. E., Rashotte A. M., Murphy A. S., Normanly J., Tague B. W., Peer W. A., Taiz L., Muday G. K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 2001. Vol. 26(2). P. 924–535.
9. Dąbrowska G., Kata A., Goc A., Szechyńska-Hebda M., Skrzypek E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family / Acta biologica cracoviensia: Series Botanica. 2007. Vol. 49, № 1. P. 7–17.
10. Gulcin I., Topal F., Cakmakc O. R., Bilsel M., Goren A. C., Erdogan U. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). J. Food Sci. 2011. Vol. 76(4). P. 585–593.
11. Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends in Plant Science. 2005. Vol. 10. № 5. P. 236–242.

12. Likhanov A. F., Burda R. I., Koniakin S. N., Kozyr M. S. Identifying species and hybrids in the genus *Juglans* by biochemical profiling of bark. *Modern Phytomorphology*. 2020. Vol. 14. P. 27–34.
13. Likhanov A.F. Identification of intervarietal affinity of *Rubus idaeus* L. plants on biochemical profiles of phenolic compounds. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2014. № 7. С.12.
14. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*. 2014. Vol. 19(10). P. 16240–16265.
15. Salminen J. P., Karonen M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. 2011. Vol. 25. P. 325–338.

#### Розділ 4

### КОМПЛЕКСНИЙ ПІДХІД ДО ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Рід Хміль (*Humulus*) відноситься до родини Коноплеві (*Cannabaceae*), порядку Кропивоцвіті (*Urticales*), підкласу Діленіїди (*Dilleniidae*), класу Магноліопсиди або дводольні (*Magnolsopsida* або *Dicotoledones*), відділу Квіткові або Покритонасінні (*Magnoliophyta Angiospermae*) [8, 11, 25]. До роду *Humulus* відносять чотири види: хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.), американський (*Humulus americanus* Rydb.), серцевидний (*Humulus cardifolius* Mig.) та японський (*Humulus japonicus* Sieb. et Zucc.). Хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.) – багаторічна дводомна рослина технічна культура, яку впродовж багатьох десятиліть вирощують в Україні [10].

Стебло хмелю однорічне, яке поділяється на підземну і надземну частини. Підземна частина, що знаходиться в ґрунті, має виразно виповнену серцевину, на якій розвиваються корінчики і закладаються бруньки. Її використовують для заготівлі живців. Надземна частина – ліана з шестиграним стеблом товщиною до 1,5 см, довжиною 10 м і більше, всередині має порожнину й міцні луб'яні волокна. Вздовж граней розміщені гачкоподібні шипи. На стеблі утворюється 40–50 і більше міжвузлів. Залежно від сорту, стебла бувають червоно-лілового або зеленого кольору. Листки хмелю супротивні з довгими черешками і прилистками [16, 26]. У нижній і середній частинах стебла вони є розсіченою пластинкою, верхній – серцевидною. З пазух листків розвиваються гілки, на вузлах яких розміщені листки. З пазух листків гілок, а іноді й стебел розвиваються квітконосні пагони та формуються шишки. Кожна зріла шишка складається з пелюсток, що розміщуються на стержні. Біля основи пелюсток шишки вкриті дрібними, блискучими лупуліновими залозами, продуктом яких є лупулін, який містить 80 % гірких речовин рослини. Плід хмелю – твердий горішок бурого кольору довжиною 3 мм і шириною 2 мм. Маса 1000 насінин – 2–4 г [6, 7, 22]. Для хмелю, як багаторічної рослини, характерно два основних способи розмноження – вегетативний і генеративний. Кращим і головним посадковим матеріалом хмелю для закладання нових і ремонту існуючих плантацій є однорічні саджанці. Вегетативні частини маточної рослини – стеблові, кореневищні і зелені живці, етиольовані паростки та зелені пагони використовують як первинний матеріал для вирощування саджанців [27]. Розмноження вегетативним шляхом розповсюджує різні захворювання вірусного, віроїдного, грибного чи бактеріального походження, що в подальшому призводить до зниження врожайності, якості сировини чи повної загибелі рослин [18]. Це вимагає ретельного дотримання технічних вимог до посадкового матеріалу, які визначаються галузевими стандартами. Одночасно з використанням традиційних методів розмноження хмелю сьогодні особливої актуальності набувають біотехнологічні методи. Методи культури ізольованих тканин та органів вже зайняли своє чільне місце в системі вирощування

оздоровленого посадкового матеріалу рослин [12]. Освоєння, удосконалення і широке впровадження у виробництво технології вирощування саджанців за допомогою культури *in vitro* забезпечує вирощування оригінального й оздоровленого садивного матеріалу зареєстрованих сортів рослин у обсягах виробничої потреби [2, 9, 24].

В Україні переважно вирощують ароматичні сорти хмелю, проте для задоволення внутрішніх потреб виробництва при виготовленні рядового пива за кордоном закупається хміль гірких сортів або продукти переробки таких сортів. Гіркі речовини, які входять до складу хмелю за хімічною будовою, фізико-хімічними та органолептичними властивостями відсутні в інших рослинах. Завдяки цій властивості хміль гіркий є незамінною сировиною при виготовленні пива. Найбільш придатними для вирощування хмелю є ґрунтово-кліматичні умови України, які склалися в Поліській та Лісостеповій зонах, де є можливість вирощувати сировину хмелю високої якості. Вирощувані сорти хмелю повинні відповідати багатьом критеріям, які ставляться до районованих сортів, основні з яких: висока та стабільна врожайність, стійкість до шкідників та збудників захворювань, придатність до вирощування за інтенсивною технологією та забезпечення необхідної для пивоваріння якості продукції – наявність відповідних речовин (альфа-кислот, бета-кислот, полі феноли, ксантогумол та ін) [15]. Хміль відноситься до найбільш специфічного, незамінного та дорогого виду сировини необхідного для виробництва пива. Отримати високоякісну продукцію хмелю можна лише за умови використання реґіонованих селекційних сортів. Це пов'язано з їх агрономічними властивостями та відповідними біохімічними складовими. При підборі селекційних сортів для вирощування в господарствах, враховують якісні показники, які є характерними ознаками сорту, тому при формуванні сортового складу виробничих насаджень основна увага повинна приділятися найкращим для пивоваріння сортам [23].

Кумир (гіркий) – сорт хмелю, отриманий в результаті багаторічної комплексної роботи українських та чеських селекціонерів [1, 3]. Він створений методом індивідуального добору з гібридної популяції, яку одержано схрещуванням дикої чоловічої рослини з Колорадо з чеським сортом Клон 72 з подальшим клонуванням. Рослина сорту Кумир - кущ циліндричної форми, облиственість середня, забарвлення головного стебла зелене, бокові гілки та черешки листків не пігментовані. Листкова пластинка слабо випукла, листки темно-зеленого кольору. Відрізняється від інших сортів тонкими черешками шишки, густою та щільною гроною. Шишки овальної форми з слабо вираженими гранями. Суцвіття легко зриваються за умов ручного і механізованого збирання. Продуктивність сорту висока. За роки конкурсного випробування (1986–1990) його врожайність була на 23,7 % вищою, ніж стандартного сорту Польський, при вмісті альфа-кислот 9,1 % проти 8,6 % у стандарту. Сорт середньостиглий (вегетативний період від масових сходів до технічної стиглості 116–119 діб), відносно стійкий до патогенів.



#### 4.1. Підбір рослин донорів хмелю за морфо-фізіологічними ознаками для культури *in vitro*

У роботі використовували маточний матеріал двох американських сортів хмелю – Ньюпорт та Нагет. Хміль звичайний добре відомий у світі завдяки речовинам вторинного метаболізму [14, 19], що акумулюються в екзогенних секреторних структурах – пельтатних багатоклітинних трихомах залозистого типу, які у репродуктивний період онтогенезу формують на поверхнях листків, суцвіть та суплідь (шишок) так звані «лупулінові зерна». Секреторні клітини залозистих трихом синтезують терпени, флавонол-глікозиди, гіркі та ароматичні смоли. Депозит вторинних метаболітів у підкутикулярну порожнину трихом відбувається за допомогою комплексу везикул, які формуються у протопласті секреторних клітин. Другим і складнішим за організацією та функціональним призначенням елементом секреторної системи хмелю звичайного є розвинута мережа внутрішніх секреторних каналів, молочників та ідіобластів, що містять складні гетерогенні комплекси продуктів секреції і екскреції [15]. Внутрішня секреторна система рослин поліфункціональна за призначенням. Вона виконує екскреторну функцію, що має важливе значення для пластичного обміну, бере участь у регуляції росту і розвитку, адаптації рослинного організму до стресових чинників, захисту від патогенних грибів, мікроорганізмів та фітофагів [18]. Проте саме вона у рослин роду *Humulus* залишається недостатньо вивченою.

Як показали наші дослідження, внутрішня секреторна система – складна багатофункціональна та динамічна. Її формуння починається на самих ранніх стадіях розвитку пагона. На початку формування вегетативного органу вона представлена секреторними каналами схизогенного та схизогенно-лізігенного типу, які, можливо, надають стеблу певні гідродинамічні властивості. Процес заповнення секреторних каналів терпенами і фенольними сполуками відбувається за участі клітин секреторного епітелію, що вистилають внутрішню порожнину. Активація синтезу вторинних метаболітів у клітинах епітелію відбувається майже синхронно, а їх депозит у внутрішню порожнину - просторово диференційований. Заповнення каналів починається у тій частині пагона, яка наближена до зовнішніх подразників, що виникають унаслідок торкання частини пагона будь-якої поверхні, яка потенційно може слугувати опорою для ліани. Виходячи з особливостей мікроморфології стебла очевидно, що рослина частіше торкається зовнішніх предметів чіпкими волосками (рис. 4.1).

У хмелю звичайного вони мають складну будову, яка представлена гачкоподібним виростом трихома, підставкою, що сформована комплексом ізодіаметричних епідермальних клітин, під яким знаходиться порожнина. Внутрішня поверхня порожнини також услана клітинами секреторного типу. Під секреторною системою виділяється група паренхімних клітин, які латерально пов'язані з волокнами склеренхімного типу. Враховуючи, що з часом у

порожнинах під чіпкими волосками утворюються доволі крупні цистоліти, тігмотропічні процеси рослини пов'язані з глибокими фізіологічними перебудовами, які у цілому мають незворотній характер. У першу чергу це пов'язано з синтезом та зосередженням у секреторних системах значної кількості поліфенольних сполук.

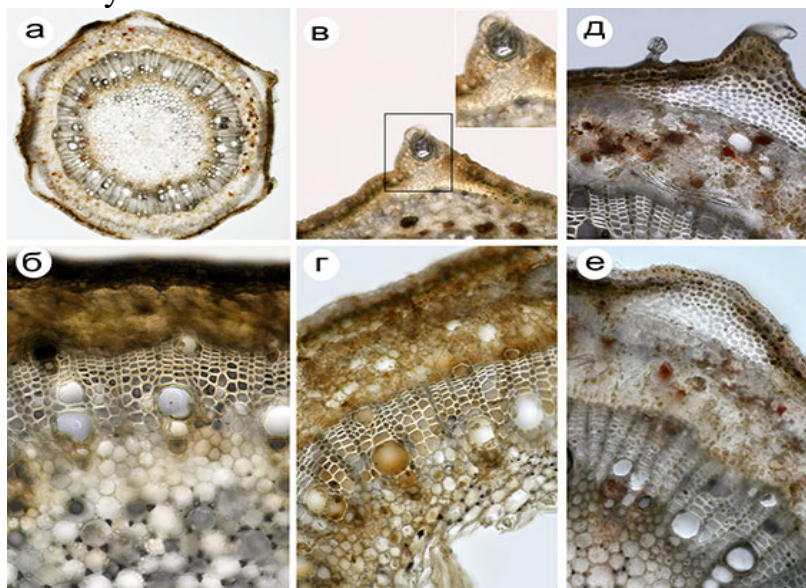


Рисунок 4.1. Гістохімічні особливості пагонів хмелю сорту Ньюпорт: а – поперечний розріз стебла; б, д – реакція фенолів на розчин  $\text{FeCl}_3$ ; в – секреторна система топічно пов'язана з чіпким трихомом; г – реакція вторинних метаболітів на розчин ваніліну з сірчаною кислотою; е – розподіл фенольних сполук і сруктурну механічних тканин

Сьогодні вже доведена роль флавоноїдів у тропізмах рослин, яка пов'язана з складним каскадом біохімічних процесів, у тому числі регуляції роботи транспортних білків, чутливості клітин до гормональних стимулів, трансмембранний перенос іонів  $\text{Ca}^{+2}$ . Здатність рослинного організму оптимально швидко захоплювати необхідний простір є важливою стратегією життя, від якого залежить сумарний результат вирощування цінної технічної культури і отримання якісної продукції.

Найбільш комерційно цінною є зовнішня секреторна система, яка представлена перш за все пельтатними багатоклітинними трихомами залозистого типу («лупулінові зерна»). Їх уміст – високо гетерогенна суміш органічних сполук, серед яких більшу частину займають терпеноїди, флавоноїди, гіркі та ароматичні речовини,  $\alpha$ - та  $\beta$ -кислоти та продукти їх окислення – гулупони, лупуленол та інші.

Найбільшу складність представляє дослідження локалізації та послідовності синтезу метаболітів та їх депонування у підкутикулярну порожнину. Враховуючи, що переважна більшість цих речовин – це оптично активні сполуки, для яких ефективно застосовувати методи люмінесцентного аналізу. За результатами наших досліджень встановлено, що на початкових

етапах формування пельтатних трихом у протопластах їх клітин накопичується значна кількість білків (показано методом гістохімічної реакції з бромфеноловим синім у присутності  $HgCl_2$ ), що зосереджені, головним чином, у цитоплазмі. Висока концентрація оксикоричних кислот виявляється у клітинах епідермального шару (рис. 4.2, 1). Фенолкабонові кислоти і флавоноїди активно синтезуються у тканинах листків, приквітників і приквітничках протягом всього періоду розвитку, але найвища активність визначається у період цвітіння рослин. За високим коефіцієнтом поглинання виявляються також конденсовані таніни, лейкоантоцінідини, галокатехіни. Локалізація речовин з високим показником емісії у синьому і синьо-зеленому спектрах виявлена нами переважно у клітинах. Транслокація цих речовин у підкутикулярну порожнину є досить обмеженою. Найінтенсивніша емісія показана у зеленому (рис. 4.2, 3) і жовтому спектрах (рис. 4.2, 4).

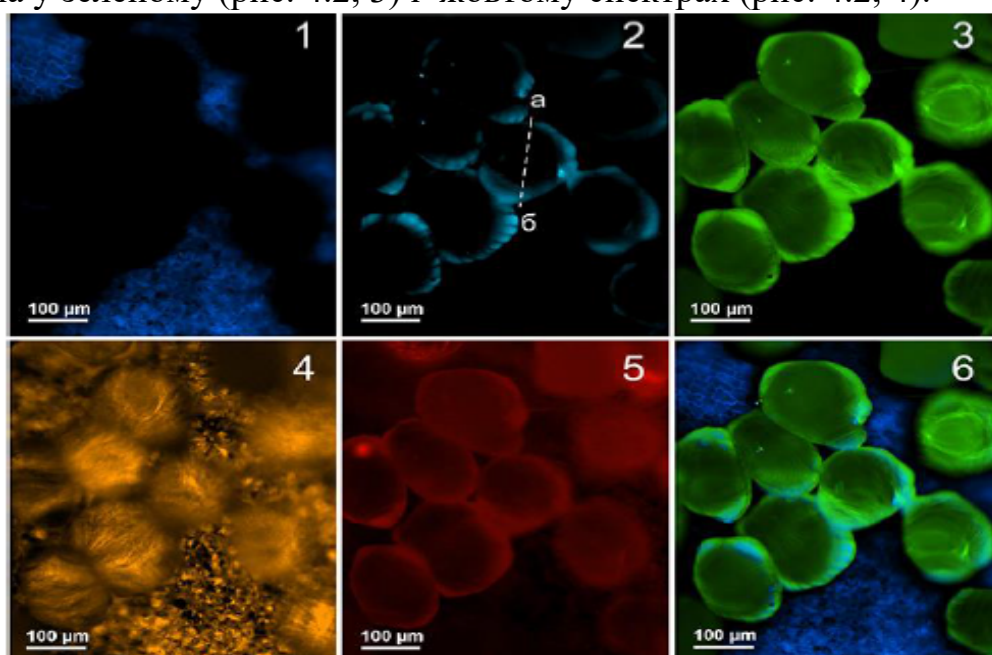


Рисунок 4.2. Автофлуоресценція залозистих трихоми хмелю сорту «Ньюпорт» наповнених вторинними метаболітами: 1 – 460 нм; 2 – 480; 3 – 520 нм; 4 – 580 нм; 5 – 640 нм; 6 – комбіноване зображення за спектрами люмінесценції – 520 нм та 460 нм

У цьому спектрі високу інтенсивність автофлуоресценції мають флаванол-глікозиди, глікозиди кверцетину та кемпферолу. Біохімічний аналіз різних сортів хмелю американської (Нагет, Ньюпорт) та української селекції показав, що за складом фенольних сполук гіркі та ароматичні сорти відрізняються у першу чергу співвідношенням глікозидів кверцетину (рис. 4.3.).

На хроматографії чітко виділяється ароматичний сорт Національний (автори - Максим Мельничук та Майя Заграфова, 2004), який містить підвищену кількість флаванол-глікозиду з  $R_f$  0,78 та незначний вміст рутину ( $R_f$  0,42). Співвідношення вмісту цих флаванол-глікозидів у американського сорту Нагет було протилежним.

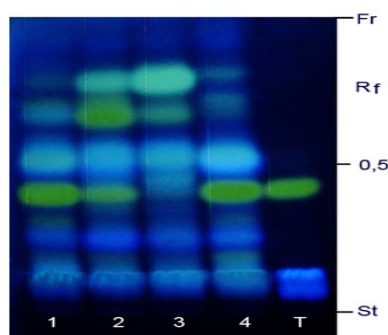


Рисунок 4.3. – Хроматограма метанольних екстрактів листків хмелю: трек 1 – сорт Нагет; трек 2 – сорт Ньюпорт; 3 – сорт Національний; 4 – сорт Нагет з симптомами грибного захворювання; Т – стандарт кверцетин –3–0–рутинозиду (рутин – 5 мкг)

За перших ознак грибного ураження в листках хмелю сорту Нагет синтез флавоноїдів збільшується у 1,4 рази, що є показником фізіологічних перебудов, активації халконсинтаз, які синтезують флавоноїди та збільшують загальний антиоксидантний потенціал рослинного організму (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Показники денситометричного визначення інтенсивності флуоресценції вторинних метаболітів у листках хмелю звичайного за площею (S) та висотою (H) піків,  $10^{-3}$

Rf	Сорт							
	Нагет I		Нагет II*		Ньюпорт		Національний	
	S	H	S	H	S	H	S	H
0,12	81,7	4,3	176,2	6,4	101,6	4,7	128,8	6,2
0,25	27,8	19,2	<b>111,1</b>	<b>5,1</b>	101,3	4,9	90,5	4,2
0,42	106,3	5,0	<b>115,2</b>	<b>5,0</b>	72,0	3,2	–	–
0,51	297,1	9,0	424,4	13,2	353,4	9,4	<b>445,2</b>	<b>10,0</b>
0,67	82,9	4,3	24,9	1,6	<b>113,1</b>	<b>3,8</b>	78,5	4,1
0,78	23,0	1,4	15,1	1,4	201,6	8,6	<b>327,1</b>	<b>11,2</b>
$\Sigma$	618,8	43,2	866,9	32,7	943,0	34,6	1070,1	35,7

\* листки хмелю сорту Нагет з ознаками грибного захворювання

Порівняльна оцінка флавоноїдного комплексу дозволяє отримати загальну уяву про характер синтетичних процесів у ароматичних і гірких сортів хмелю (Нагет, Ньюпорт). Так, за нашими даними у ароматичного сорту хмелю Національний загальна кількість флавоноїдів збільшується, проте вміст рутину зменшується у 1,5–2,0 рази.

Фотоденситометрія з використанням стандартів рутину дозволила встановити кількісні показники концентрації рутину у досліджуваних

сортозразках. Для цього було побудовано калібрувальну криву (рис. 4.4), яка описана рівнянням першого порядку ( $y = 7336,6 x$ ). Кількісні показники вмісту рутину наведено у таблиці 4.2.

Нами було встановлено, що у листках хмелю синтез продуктів вторинного метаболізму має сортоспецифічний характер [20], який, проте, залежить від умов вирощування рослин, фенофази і ярусу вегетативних органів, наявності інфекційних процесів та інвазій.

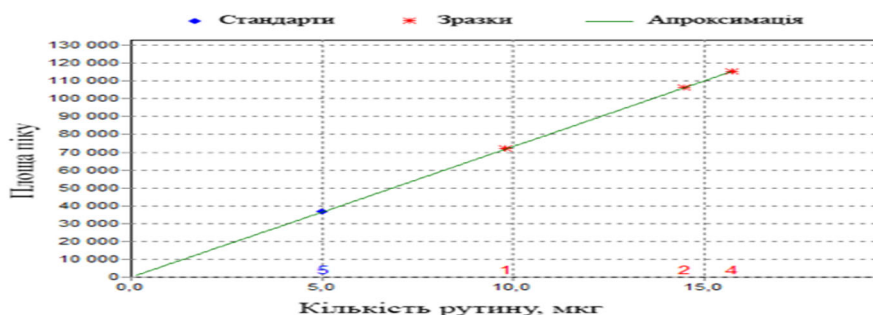


Рисунок 4.4 – Калібрувальний графік для визначення вмісту рутину в листках хмелю за результатами денситометричного аналізу хроматограми

Такий висновок узгоджується з поглядами інших авторів, проте слід зазначити, що загальний склад речовин фенольної природи, біохімічний портрет («фінгерпринт») різних сортів залишається досить унікальним.

Таблиця 4.2

Вміст кверцетин–3–0–рутинозиду в листках гірких та ароматичних сортів хмелю звичайного

Стандарт/сортопроба	Кількість, мкг/г
Нагет I	>14,5
Нагет II	>15,8
Ньюпорт	> 3,8
Національний	до 1,0
Стандарт кверцетин–3–0–рутинозиду (рутину)	5,0

Таким чином, за умов оптимального алгоритму вивчення складу вторинних метаболітів може бути валідним і інформативним методом досліджень якісних характеристик сорту, його продуктивності, адаптаційного потенціалу та інших важливих екофізіологічних показників рослин.

#### 4.2. Оздоровлення рослин хмелю *in vitro* через використання наноаквахелатних комплексів мікроелементів

Культитивування ізольованих бруньок хмелю проводили на модифікованих живильних середовищах, які відрізняються не тільки за складом мінеральних солей, джерелом вуглецю, концентрацією фітогормонів та їхнім співвідношенням, а й наявністю наноаквахелатних форм макро– та мікроелементів – заліза і селену, що призводить до різних морфогенетичних

процесів. Виходячи з цього, на першому етапі перед нами постало питання підбору базового середовища з визначеним співвідношенням мінеральних солей, яке було б оптимальним для культивування ізольованих бруньок хмелю. Для цього використовували два живильних середовища, які найчастіше застосовують при клональному розмноженні хмелю. Вони містять мінеральні солі за прописами Мурасіге і Скуга (МС) та Уайта з додаванням наноаквахелатних комплексів заліза і селену (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Склад модифікованих живильних середовищ для клонального мікророзмноження рослин хмелю, мг/л

Мінеральні солі	Середовище Мурасіге –Скуга	Середовище Уайта
Макроелементи		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	-
$\text{KNO}_3$	1900	80
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	300
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	720
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-
$\text{Na}_2$ ЕДТА	37,23	0,37
nano Fe (NHF)	27,95	2,5
KCl	-	65
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16,5
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ б/в	-	200
Мікроелементи		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	1,5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	3,0
KJ	0,83	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,001
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	530
nano Se (NHS)	0,05	0,05

Середовища відрізняються одне від одного за складом азоту, фосфору та калію, які у складі мінеральних солей по МС містяться у значно більших кількостях, ніж за Уайтом.



При вивченні впливу складу мінеральних солей у обидва середовища додавали мезоінозит (100 мг/л), тіамін–HCl (0,1 мг/л), піридоксин–HCl (0,5 мг/л) і нікотинову кислоту (0,5 мг/л), а як джерело вуглецю використовували глюкозу, сахарозу (30 мг/л) та агар (0,7 %). На етапі введення первинних експлантатів у культуру *in vitro* до запропонованих варіантів середовищ вносили БАП (0,5 мг/л) та вітамін С (1,0 мг/л).

Отримані результати показали, що на цих варіантах середовищ бруньки залишались зеленими (крім контролю), але активна регенерація пагонів рослин хмелю спостерігалась лише на середовищі МС (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Вплив наноаквахелату заліза (NHF) на індукцію пагоноутворення з вегетативних бруньок хмелю звичайного

Варіант модифікованого середовища	Пагоноутворення, %	Інтенсивність регенерації*
МС (контроль) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	17,3 ±1,1	низька
Уайта (контроль) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	12,0 ±0,9	низька
МС + NHF (28,0 мг/л) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	56,6 ±0,6	середня
Уайта +NHF (2,5 мг/л) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	26,6 ±0,3	низька
МС + NHF (2,8 мг/л) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	86,6 ±1,5	активна
Уайта + NHF (0,25 мг/л) + БАП (0,5 мг/л) + С (1,0 мг/л)	38,0 ±1,0	середня

\*Примітка: активна регенерація – утворення 2-х та більше пагонів; середня регенерація – утворення одного оптимально розвинутого пагону; низька регенерація – відмирання бруньки, частково зелене забарвлення бруньки

Через 7–10 діб з моменту висадження бруньок на живильні середовища спостерігали початковий ріст пагонів. Активнішу, ніж у контролі регенерацію отримано на середовищі, яке містять мінеральні солі за прописами Мурасіге і Скуга МС з додаванням NHF (25 мг/л), вітаміну С та глюкози. На середовищі Уайта (У) з додаванням NHF (2,5 мг/л), вітаміну С і глюкози також виявлено формування пагонів, які були поодинокі і характеризувались світло–зеленим забарвленням, редукованою листовою пластинкою та тонким стеблом, біля основи пагонів іноді відбувалось формування білого пухкого калюсу.

На 28–30 добу культивування довжина цих пагонів у середньому становила 1,5–2 см. На середовищі МС з додаванням NHF (1:10), БАП, вітаміну С і глюкози відзначено активний ріст пагонів, кількість яких сягала 5 шт., що свідчить про активізацію пазушних меристем. Водночас довжина пагонів у середньому становила 3,5 см. Аналіз отриманих результатів показав, що активніший ріст пагонів хмелю на модифікованих середовищах МС обумовлений більшим вмістом у стандартних прописах калію, натрію та

фосфору, а також високою фізіологічною активністю наноаквахелатної форми заліза, яка сприяє нормальному росту і розвитку рослини (рис. 4.5)

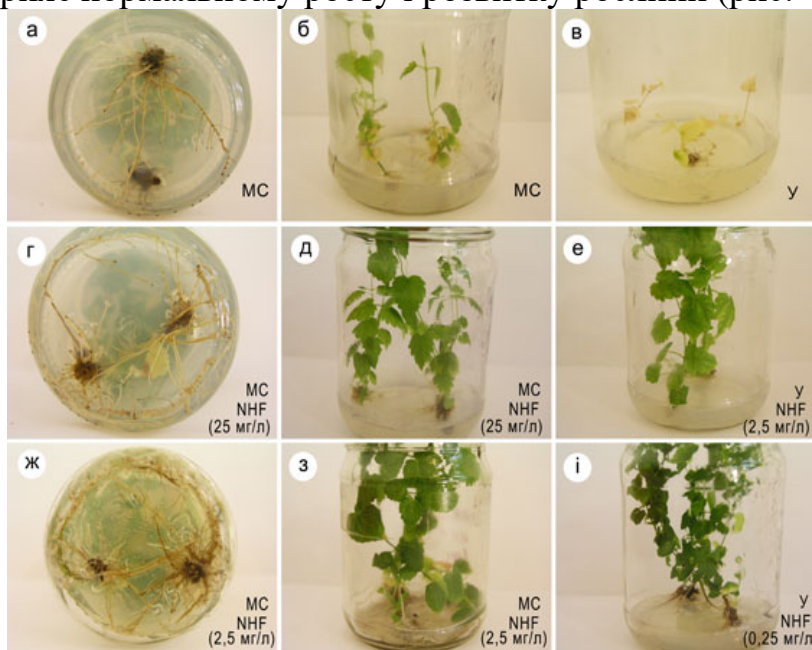


Рисунок 4.5. Розвиток рослин–регенерантів хмелю сорту Національний на стандартних МС і У (Уайта) – (а–в) і модифікованих – (г–і) живильних середовищах (пояснення у тексті)

За умов зменшення концентрації NHF (2,8 мг/л) у 10 разів спостерігався активний розвиток пагонів з вихідних вегетативних бруньок, а також утворення адвентивних пагонів безпосередньо на експлантатах хмелю. Про це свідчив і значний відсоток інтенсивності пагоноутворення – 86,6 %. За таких умов культивування середня довжина пагонів становила (3,5 см).

У ході подальших біотехнологічних досліджень було з'ясовано, що наноаквахелатні форми селену є надзвичайно активним елементом живлення рослини, а фізіологічна доступність наночастинок мікроелементу перевищує природні форми мікроелементу, внаслідок чого внутрішньоклітинні процеси трансформації селену та залучення його до фізіологічних процесів значно ускладнюються. Наноаквахелат селену у дозах вищих за 0,1 мг/л пригнічує рослинний організм. За умов використання розчинів селену у концентраціях нижчих за граничне значення (0,1 мг/л) рослини хмелю в культурі *in vitro* активізують фізіологічні процеси синтезу фенольних сполук. Експериментально встановлено, що додавання наноаквахелатного комплексу селену в концентрації 0,05–0,1 мг/л активізує процеси калусогенезу, формування пагонів і стимулює ризогенез рослин хмелю в культурі *in vitro*

Встановлено, що за оптимальних концентрацій наноаквахелатний комплекс селену прискорює адаптацію і розвиток експлантатів рослин хмелю в культурі *in vitro*. Визначено, що оптимальна концентрація мікроелементу у нанохелатній формі в живильних середовищах МС – 0,1 мг/л; концентрація 10 і 20 мг/л є сублетальною і летальною відповідно.

Таким чином, наноаквахелатні форми заліза і селену у збалансованих концентраціях (2,5 мг/л і 0,1 мг/л відповідно) покращують загальний стан рослин хмелю в умовах *in vitro* та сприяють процесам регенерації і можуть бути рекомендовані для мікроклонального розмноження цієї культури.

#### **4.3. Підбір оптимальних концентрацій і форм нанорозмірних частинок біогенних металів для інтенсифікації процесів мікроклонального розмноження хмелю**

Об'єктом дослідження слугували експлантати пагонів хмелю (*Humulus lupulus* L.) сорту Кумир, який культивували в культурі *in vitro*

Для культивування експлантатів хмелю використовували живильні середовища МС (½ концентрації) з додаванням з 0,1 мг/л БАП і 1,0 мг/л ІОК і 15 г/л глюкози, що в наших дослідженнях є контрольним. У ході експерименту випробовували вплив окремих макро- та мікросолей на морфогенну та ризогенну активність рослин хмелю. Для цього нами було використано ряд варіантів середовищ, у кожному з яких було заміщення однієї солі іншою, а саме: 1 Варіант – контроль (середовище базове); 2 Варіант – Mg 18 мг/л; 3 Варіант–Fe 5,56 мг/л; 4 Варіант–Zn 1,9 мг/л; 5 Варіант–Cu 6,4 мкг/л; 6 Варіант–Mo 99 мкг/л; 7 Варіант–Mg 36 мг/л ;8 Варіант– Fe 11,12 мг/л; 9 Варіант– Zn 3,8 мг/л; 10 Варіант– Cu 12,8 мкг/л; 11 Варіант– Mo 198 мкг/л; 12 Варіант– Fe+Mg (5,56мг/л+18 мг/л); 13 Варіант– Fe+Cu (5,56 мг/л+6,4 мкг/л); 14 Варіант– Fe+Cu+Zn (5,56 мг/л+6,4 мкг/л+1,9 мг/л); 15 Варіант– без додавання Mg; 16 Варіант– без додавання Fe; 17 Варіант– без додавання Zn; 18 Варіант– без додавання Cu; 19 Варіант– без додавання Mo.

Рослини–регенеранти хмелю, що культивували в культурі *in vitro* розділяли на сегменти та розміщували на ряд живильних середовищ МС, у кожному з яких було заміщення однієї солі іншою, а саме: 1 Варіант – контроль (середовище базове); 2 Варіант – Mg 18 мг/л; 3 Варіант–Fe 5,56 мг/л; 4 Варіант–Zn 1,9 мг/л; 5 Варіант–Cu 6,4 мкг/л; 6 Варіант–Mo 99 мкг/л; 7 Варіант–Mg 36 мг/л ;8 Варіант– Fe 11,12 мг/л; 9 Варіант– Zn 3,8 мг/л; 10 Варіант– Cu 12,8 мкг/л; 11 Варіант– Mo 198 мкг/л; 12 Варіант– Fe+Mg (5,56мг/л+18 мг/л); 13 Варіант– Fe+Cu (5,56 мг/л+6,4 мкг/л); 14 Варіант– Fe+Cu+Zn (5,56 мг/л+6,4 мкг/л+1,9 мг/л); 15 Варіант– без додавання Mg; 16 Варіант– без додавання Fe; 17 Варіант– без додавання Zn; 18 Варіант– без додавання Cu; 19 Варіант– без додавання Mo. Як контроль було використано середовище МС (½ концентрації) з додаванням з 0,1 мг/л БАП і 1,0 мг/л ІОК і 15 г/л глюкози (рис. 4.6). Обліки здійснювали на 14 та 21 добу культивування.

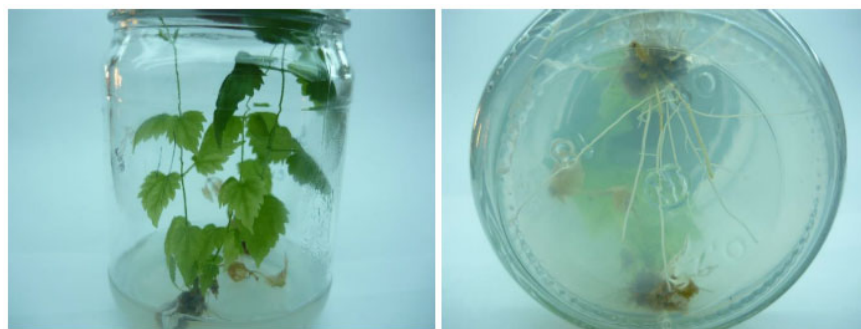


Рисунок 4.6. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на контрольному середовищі МС (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система

Результати досліджень показали, що використання цих солей неоднаково впливають на ріст і розвиток рослин хмелю. Так, на 14 добу культивування використання Mg в концентрації 18 та 36 мг/л окремо або в поєднанні із Fe 5,56 мг/л суттєвої різниці не відмічали (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (14 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц. мг/л	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт.	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт.	см		шт.	см		
1	контроль	–	1,4	1,5	2,3	6,8	0,11	+	3
2	Mg	18	1,08	1,1	1,3	0,4	0,3	+	3
7	Mg	36	1,0	2,5	2,5	0,6	0,25	–	3–84 % 3/Ж–16 %
12	Fe Mg	5,56 18	1,1	1,1	1,4	0,6	0,5	+ 58,3 %	3–83,3 % 3/Ж–16,7 %
15	Mg	–	1,1	1,8	2,7	0,5	0,3	+ 66,6 %	3–41,6 % 3/Ж–58,4 %

Примітка: (+) – утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (3) – зелені мікропагони; (3/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

Довжина пагону на всіх варіантах становила 1,1–2,5 см, кількість міжвузль в середньому відповідала 1,3–2,5 шт. на експлантат, кількість новоутворених пагонів не перевищувала 1, у порівнянні з контролем 1,4 шт. Кількість укорінених мікропагонів становила для варіанту № 2–33,3 %, № 7–66,6 %, № 12–41,6 %. Характерною ознакою для цих варіантів – розміщення повітряних коренів, довжина їх не перевищувала 0,5 см. На середовищі (№ 15) без додавання Mg, укорінених експлантатів становило 50 %, при цьому відмічали найбільшу кількість утворення калюсу при основі пагона, що

становила 66,6 %. Утворення калюсу зафіксували на середовищі № 2 – на всіх експлантатах, як і на контролі, а № 12 – 58,3 %. На 14 добу культивування на варіантах № 7, 12, 15 пагони набули зелено-жовтого забарвлення і подальший ріст значно сповільнювався. Так, на варіанті № 7 кількість зелених мікропагонів становила 84 %, № 12 - 83,3 %, за відсутності Mg (№ 15) - 41,6 %. Тільки на варіанті № 2, як і на контролі, – 100 % зелених життєздатних експлантатів (табл. 4.8). На 21 добу культивування середовище № 2, до складу якого входить Mg 18 мг/л, в порівнянні з попередніми дослідженнями, отримали 25 % хлоротичних рослин-регенерантів, укорінених збільшилось лише на 5 % (рис. 4.7). На варіанті № 7, де норма Mg збільшили вдвічі, кількість життєздатних рослин-регенерантів становила 100 %, і кількість вкорінених рослин відповідала 100 % (рис. 4.8). На середовищі № 12 (Mg в поєднанні з Fe) кількість хлоротичних експлантатів збільшилась до 65,2 %, з них 12,5 % - не життєздатні, але число вкорінених мікропагонів зросло до 33,4 %, і відповідало 75 %. На середовищі № 15, де Mg не додавали взагалі, кількість життєздатних експлантатів зменшилась до 37,5 % з характерною ознакою – деформація та скручування листової пластинки, кількість нежиттєздатних зросла до 61,5 %. (рис. 4.7).



Рисунок 4.7. Рослини-регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Mg 18 мг/л в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система



Рисунок 4.8. Рослини-регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Mg 36 мг/л в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система



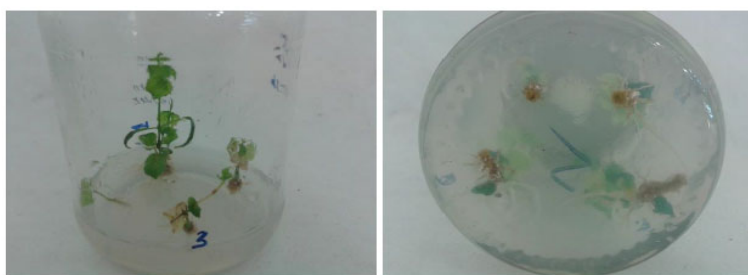


Рисунок 4.9. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Mg без додавання Mg в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система

Найінтенсивніший ріст пагонів відбувався на середовищі № 7 та 12, де довжина збільшилася вдвічі, а кількість новоутворених пагонів збільшталась теж майже вдвічі на середовищі № 2 та 7 (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (21 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц. мг/л	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт	см		шт	см		
1	контроль	–	2,1	3,7	4,6	8,5	1,6	–	З
2	Mg	18	1,75	1,9	3,6	0,7	2,1	–	З–75 % З/Ж– 25 %
7	Mg	36	1,8	4,9	4,4	7,5	2,8	–	З
12	Fe Mg	5,56 18	1,6	2,0	3,1	5,2	1,1	–	З–37,5 % З/Ж–50 % Ж– 12,5 %
15	Mg	–	1,2	2,5	3,9	3,0	0,9	–	З–37,5 % З/Ж–1,25 % Не життєздатні– 61,25 % (Деформовані 37,5 %)
Примітка: (+)– утворення калюсу; (–)– відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено–жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати									

За концентрацією Fe 5,56 мг/л на 14 добу культивування наявність зелених мікропагонів відповідала 100 %, з яких укорінених становило 62,5 %, і на 100 % експлантатів відмічали утворення калюжної маси на основі пагону.



Збільшуючи концентрацію Fe до 11,12 мг/л кількість зелених пагонів становила 41,7 %, решта 25 % світло-зеленого кольору, а 33,3 % – жовтого. Використання Fe в концентрації 5,56 мг/л; Cu 6,4 мкг/л та Zn 1,9 мг/л (середовище № 14): кількість укорінених мікропагонів становила 8,3 %, зелених мікропагонів - 33,3 %. За виключення Fe зі складу живильного середовища спостерігали утворення мікропагонів зеленого забарвлення, кількість укорінених становила 75 %, у 50 % мікропагонів зафіксували наявність калюсу (табл. 4.9).

На 21 добу культивування використання Fe в концентрації 5,56 мг/л призвело до збільшення кількості мікропагонів і становило 1,7 шт. на експлантат, кількість укорінених мікропагонів відповідала 50 %, а кількість жовто-зелених рослин зросла до 62,5 % (рис. 4.10).

Таблиця 4.9.

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (14 доба культивування)

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт.	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт.	см		шт.	см		
1	контроль	–	1,4	1,5	2,3	6,8	0,11	+	3
3	Fe	5,56 мг/л	1,08	1,3	1,4	0,5	0,2	+	3
8	Fe	11,12 мг/л	1,08	2,5	2,5	1,0	0,3	–	3–41,7 % З/Ж–25 % Ж–33,3 %
12	Fe Mg	5,56 мг/л 18 мг/л	1,1	1,1	1,4	0,6	0,5	+ 58,3 %	3–83,3 % З/Ж–16,7 %
13	Fe Cu	5,56 мг/л 6,4 мкг/л	1,0	2,2	1,5	–	–	–	3–16,7 % З/Ж–58,3 % Ж–25 %
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	1,0	1,1	1,1	0,2	0,2	–	3–33,3 % З/Ж–50 % Ж–16,7 %
16	Fe	–	1,4	2,5	3,1	5,5	0,7	+ 50 %	3

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–)– відсутність калюсу; (3) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

Використання подвійної концентрації Fe 11,12 мг/л, кількість зелених життєздатних експлантатів збільшилось до 50 %, тоді як на 14 добу культивування їх кількість відповідала 41,7 %, вдвічі збільшилася і кількість укорінених пагонів та становила 62,5 % (рис. 4.10).

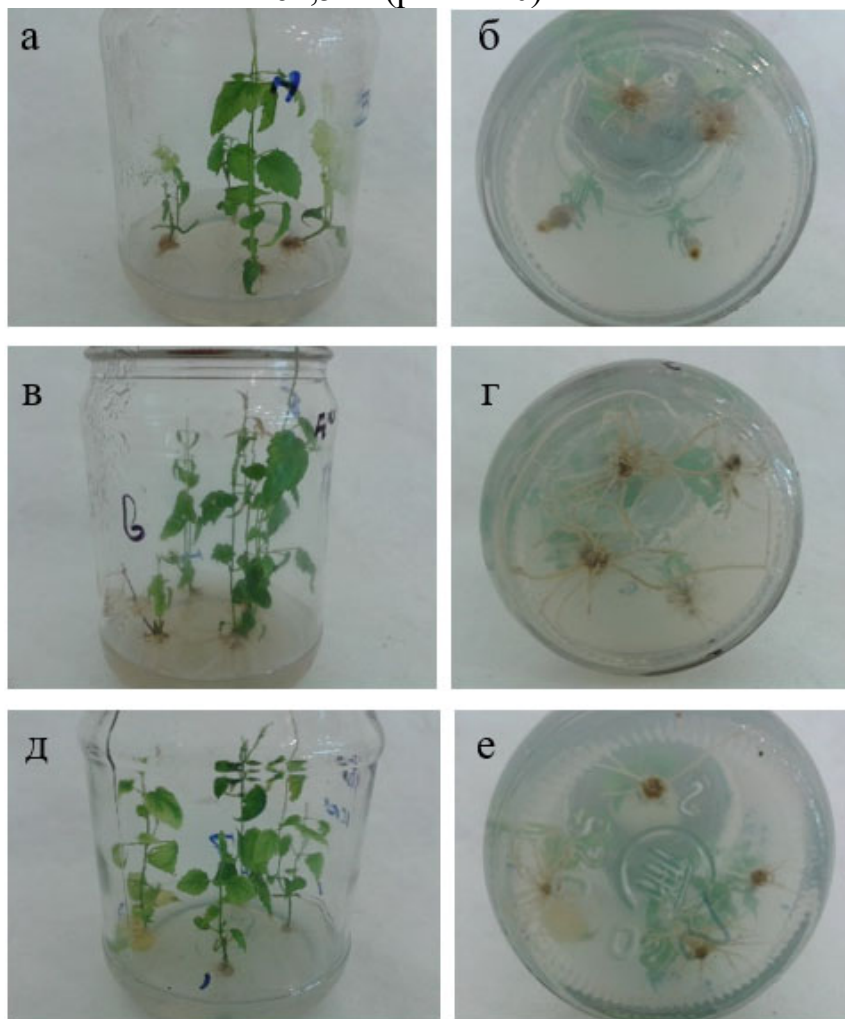


Рисунок 4.10. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Fe 5,56 мг/л (А,Б); Fe 11,12 мг/л (В,Г); МС без додавання Fe (Д, Е) в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А, В, Д – мікропагони; Б, Г, Е – коренева система

На 21 добу культивування на середовищі без додавання Fe кількість мікропагонів у середньому збільшилася до 2,2 шт. на експлантат (табл. 4.10). Зелених життєздатних мікропагонів лишилось 37,5 %; хлоротичних 50 %, нежиттєздатних 12,5 %, тоді як на 14 добу кількість зелених життєздатних пагонів становила 100 % (рис. 4.10).

При культивуванні експлантатів хмелю на середовищі МС, де  $ZnSO_4$  був замінений на Zn в концентрації 1,9 мг/л (варіант № 4); 3,8 (варіант № 9) мг/л, Zn 1,9 мг/л в поєднанні Fe 5,56 мг/л і Cu 6,4 мкг/л (варіант № 14), а також середовище (варіант № 17), де Zn було виключено взагалі. Для контролю застосували середовище за прописом МС. На 14 добу культивування на середовищі з Zn в

концентрації 1,9 мг/л, порівняно з контролем, експлантати хмелю (їх довжина та кількість утворених мікропагонів) коливалися в одних межах, а саме – 1,0–1,4 шт. на експлантат, довжиною 1,2–1,5 см. Кількість укорінених мікропагонів в середньому відповідала 33,3 %, тоді як контроль відповідав 58,3 %, наявність калюсу при основі пагона становив 100 % експлантатів.

Таблиця 4.10

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (21 доба культивування)

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт	см		шт	см		
1	контроль	–	2,1	3,7	4,6	8,5	1,6	–	3
3	Fe	5,56 мг/л	1,7	1,7	3,2	8,5	1,2	–	3–37,5 % 3/Ж–62,5 %
8	Fe	11,12 мг/л	1,6	3,3	3,5	8,2	1,4	–	3–50 % 3/Ж – 50 %
12	Fe Mg	5,56 мг/л 18 мг/л	1,6	2,0	3,1	5,2	1,1	–	3–37,5 % 3/Ж–50 % Ж– 12,5 %
13	Fe Cu	5,56 мг\л 6,4 мкг/л	–	–	–	–	–	–	3/Ж–12,5 % Не життєздатні – 87,5 %
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	–	–	–	–	–	–	Не життєздатні
16	Fe	–	2,2	4,4	4,2	7,6	1,1	–	3–37,5 % 3/Ж–50 % Не життєздатні – 12,5 %

Примітка: (+) – утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

На контрольному середовищі кількість зелених експлантатів дорівнювала 100 %, на середовищі № 4 – 75 %; а експлантати з хлоротичним забарвленням відповідала 25 %. На середовищі № 9 кількість утворених пагонів та міжвузль коливалися в тих же межах, що і контроль та середовище № 4, тільки довжина

мікропагонів перевищувала вдвічі, наявність коренів взагалі відсутня, а калюс присутній тільки в 33,3 % експлантатів. Кількість зелених мікропагонів знижена до 25 %, хлоротичних – 50 %, не життєздатних 25 %. На середовищі, де Zn взагалі випускається, кількість мікропагонів та їхні розміри коливаються в межах контролю, а кількість зелених експлантатів знижено до 58,3 %, наявність хлоротичних забарвлень відмічали у 41,7 % мікропагонів хмелю. Кількість вкорінених мікропагонів дорівнювала 50 %, а з калюсом зафіксовано 66,6 % мікропагонів (табл. 4.11).

На 21 добу культивування експлантатів хмелю на середовищі МС з Zn в концентрації 1,9 мг/л відмічали незначний приріст пагонів, а саме - довжина збільшилася в середньому на 0,3 см. Кількість укорінених рослин зросла до 40 %, але кількість зелених експлантатів знизилась до 62,5 % з них 37,5 % є деформованими, а число хлоротичних мікропагонів становило 37,5 %. Також знизилась кількість мікропагонів з калюсом із 100 % до 12,5 %, що свідчить про збільшення кількості вкорінених мікропагонів (рис. 4.11).

Таблиця 4.11.

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (14 доба культивування)

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт.	см		шт.	см		
1	контроль	–	1,4	1,5	2,3	6,8	0,11		
4	Zn	1,9 мг/л	1,0	1,2	1,5	0,6	0,3	+	З–75% З/Ж–25%
9	Zn	3,8 мг/л	1,08	3,2	2,9	–	–	+	З–25% З/Ж–50% Ж–25%
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	1,0	1,1	1,1	0,2	0,2	–	З–33,3% З/Ж–50% Ж–16,7%
17	Zn	–	1,1	1,9	2,5	1,8	0,8	+	З–58,3% З/Ж–41,7%

Примітка: (+) – утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

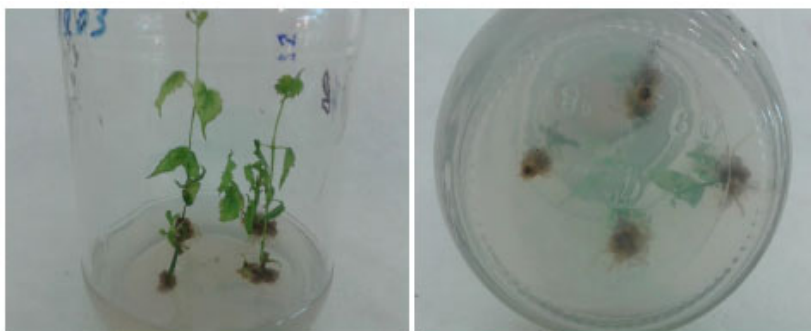


Рисунок 4.11. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Zn 1,9 мг/л в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система

Середовище, до складу якого Zn не входив: кількість зелених життєздатних експлантатів зросла до 100 %, але число деформованих становило 50 %, довжина мікропагонів зросла і відповідала 3,7 см, з кількістю міжвузль в судньому становила 4,2 шт. Кількість вкорінених мікропагонів зросла до 75 %, в середньому 5,0 шт. коренів на експлантат довжиною 1,1 см (табл. 4.12).

Таблиця 4.12

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (21 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт	см		шт	см		
1	контроль	–	2,1	3,7	4,6	8,5	1,6	–	З
4	Zn	1,9 мг/л	1,2	1,5	3,1	1,2	0,5	+ 12,5 %	З–62,5% З/Ж–37,5% (Деформовані –37,5%)
9	Zn	3,8 мг/л	0,6	2,3	2,6	–	–	–	З–25 Не життєздатні –75%
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	–	–	–	–	–	–	Не життєздатні
17	Zn	–	1,5	3,7	4,2	5,0	1,1	–	З–100% (Деформовані 50%)

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено–жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

Із збільшенням концентрації Zn до 3,8 мг/л кількість життєздатних експлантатів знизилась до 25 %, а укорінення не спостерігали взагалі (рис. 4.12).

На 14 добу культивування хмелю на середовищі з Cu в концентрації 6,4 мкг/л експлантати мали зеленее забарвлення. У 58,3 % при основі пагона спостерігали утворення калюсу, число вкоріnenних мікропагонів становило 41,6 %, кількість коренів в середньому становило 0,4 шт. на експлантат, довжиною 0,4 см. При збільшенні концентрації Cu вдвічі кількість утворених пагонів дорівнює 1, як і в попередньому варіанті, кількість зелених мікропагонів становить 83,3 %, хлоротичних – 16,7 %, але вкоріnenних тільки 16,6 % та 41,6 % кількість пагонів з калюсом при основі (рис. 4.13). За відсутності Cu кількість утворених пагонів та їхня довжина знаходилася в тих же межах, що і попередні варіанти, різниця ж була в інтенсивності утворення коренів та їх довжині, що відповідала в середньому 5,1 шт. на експлантат, довжиною 0,7 см, утворення калюсу при основі пагона не спостерігали, в порівнянні з контролем, де зафіксовано 100 % пагонів з калюсом. Число зелених мікропагонів становило 66,6 %, хлоротичних – 25 %, а не життєздатних – 8,4 % (табл. 4.13).

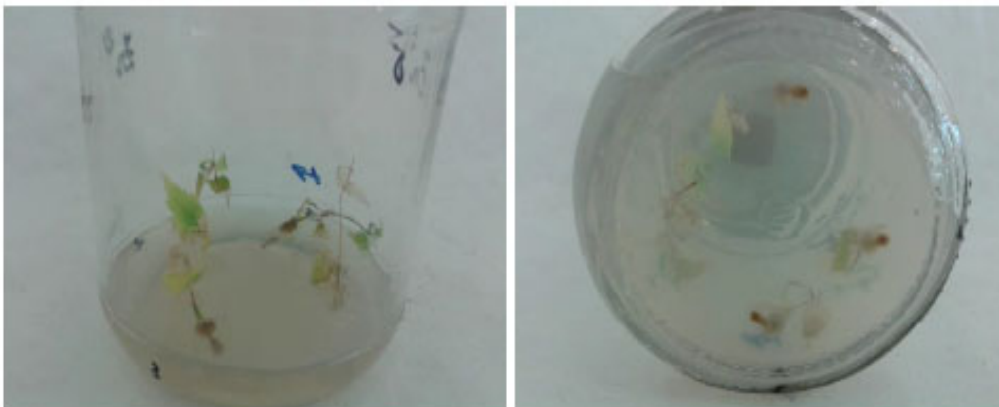


Рисунок 4.12 – Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Zn 3,8 мг/л в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система.



Рисунок 4.13 – Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі без МС без додавання Zn в культурі *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система.



Таблиця 4.13

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (14 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт.	см		шт.	см		
1	контроль	–	1,4	1,5	2,3	6,8	0,11	+	3
5	Cu	6,4 мкг/л	1,0	1,0	1,6	0,4	0,4	+ 58,3 %	3
10	Cu	12,8 мкг/л	1,0	2,6	2,5	0,4	0,2	+ 41,6 %	З– 83,3% З/Ж–16,7%
13	Fe Cu	5,56 мг/л 6,4 мкг/л	1,0	2,2	1,5	–	–	–	З–16,7% З/Ж–58,3% Ж–25%
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	1,0	1,1	1,1	0,2	0,2	–	З–33,3% З/Ж–50% Ж–16,7%
18	Cu	–	1,08	2,0	1,7	5,6	0,7	–	З–66,6% З/Ж–25% Ж– 8,4%

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

При збільшенні концентрації Cu вдвічі кількість вкорінених мікропагонів зросла до 37,5 %, але кількість зелених мікропагонів знизилась до 37,5%, 50% – становили не життєздатні мікропагони (табл. 4.14). На середовищі без додавання Cu кількість зелених мікропагонів зросла до 75 %, кількість вкорінених відповідала 87,5 %.

Таблиця 4.14

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (21 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц.	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт	см		шт	см		
1	контроль	–	2,1	3,7	4,6	8,5	1,6	–	З
5	Cu	6,4 мкг/л	1,1	3,5	3,8	0,8	0,9	+ 12,5 %	З–25% З/Ж–75%
10	Cu	12,8 мкг/л	1,0	4,1	2,5	3,7	1,6	–	З– 37,5% З/Ж–12,5 Не життєздатні – 50%
13	Fe Cu	5,56 мг/л 6,4 мкг/л	–	–	–	–	–	–	З/Ж–12,5% Не життєздатні – 87,5%
14	Fe Cu Zn	5,56 мг/л 6,4 мкг/л 1,9 мг/л	–	–	–	–	–	–	Не життєздатні
18	Cu	–	1,2	4,6	5,3	5,6	1,7	–	З–75% З/Ж–12,5% Не життєздатні – 12,5% (Деформовані – 25%)

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

На 21 добу культивування мікропагонів хмелю на середовищі МС з Cu в концентрації 6,4 мкг/л порівняно з контролем пагони відставали в рості майже вдвічі, чмсло зелених мікропагонів становило 25 %, хлоротичних - 75 % (рис. 4.14).



Рисунок 4.14. Мікропагони хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Cu 6,4 мкг/л в культурі *in vitro* (21 доба культивування)

На середовищі МС з Мо в концентрації 99 мкг/л кількість зелених життєздатних експлантатів становила 83,4 %, довжиною в середньому 1,1 см з 1,4 кількістю міжвузль, кількість укорінених рослин дорівнювала 16,6 %, без ознак утворення калюсу при основі пагона (рис. 4.15). Довжина кореневої системи в середньому становила 0,25 см, 0,1 шт. на експлантат, порівняно з контролем, де кількість пагонів була 6,8 шт. довжиною 0,11 см. Збільшуючи концентрацію Мо вдвічі, тобто 198 мкг/л, кількість зелених експлантатів становила 100 %, міжвузль – 2,0 шт., наявність калюсу відмічали в 16,6 %, утворених коренів, кількістю в середньому 0,5 шт., довжиною 0,5 см. На середовищі без додавання Мо кількість зелених експлантатів становила 75 %, хлоротичних – 8,4 %, не життєздатних - 16,6 %, без наявності ознак калюсу. Кількість вкорінених експлантатів дорівнювала 66,6 %, кількість коренів – 6,6 шт. довжиною 0,8 см (табл. 4.15)



Рисунок 4.15. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС без додавання Си в культуру *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система

Таблиця 4.15

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (14 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц. мкг/л	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт.	см		шт.	см		
1	контроль	–	1,4	1,5	2,3	6,8	0,11	+	3
6	Мо	99	1,0	1,1	1,4	0,1	0,25	–	З–83,4% З/Ж–16,6%
11	Мо	198	1,1	1,7	2,0	0,6	0,5	+ 16,6%	3
19	Мо	–	1,08	1,8	2,1	6,6	0,8	–	З–75% З/Ж–8,4% Ж– 16,6%

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено–жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

На 21 добу культивування на середовищі № 6, де концентрація Мо відповідала 99 мкг/л, кількість життєздатних зелених експлантатів знизилася до 37,5 %, порівняно з попередніми дослідженнями, де вона становила 83,4 %. Кількість не життєздатних мікропагонів зросла до 62,5 % (рис. 4.16). На середовищі МС з Мо 198 мкг/л кількість утворених пагонів дорівнювала 2,0 шт. на експлантат довжиною до 3 см, кількість міжвузль в середньому становила 3,4 шт (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

Результати спостережень за розвитком експлантатів хмелю сорту Кумир на різних варіантах середовища (21 доба культивування).

Варіант	Склад	Конц. мкг/л	Середня кількість утвор. пагонів,		Середня кількість міжвузль шт	Середня кількість коренів,		Наявність калюсу, %	Забарвлення рослин
			шт	см		шт	см		
1	контроль	–	2,1	3,7	4,6	8,5	1,6	–	3
6	Мо	99	0,3	1,0	2,0	–	–	–	З/Ж–37,5 Не життєздатні –62,5%
11	Мо	198	2,0	3,0	3,4	5,0	1,5	–	3– 75% Не життєздатні – 25% (Деформовані –12,5%)
19	Мо	–	1,6	3,6	5,2	7,2	1,7	–	3–62,5% З/Ж–12,5% Не життєздатні – 25%

Примітка: (+)– утворення калюсу; (–) – відсутність калюсу; (З) – зелені мікропагони; (З/Ж) – зелено-жовті мікропагони; (Ж) – жовті нежиттєздатні експлантати

Кількість зелених життєздатних експлантатів складала 75 %, але у 12,5 % мікропагонів відмічали деформацію листової пластинки та затримку в рості; не життєздатних експлантатів було до 25 %. Кількість вкорінених експлантатів – 62,5 %, в середньому 5,0 шт. коренів на експлантат довжиною до 1,5 см (рис. 4.17). На середовищі без додавання Мо кількість зелених життєздатних експлантатів знизилася до 62,5 %, хлоротичних – 12,5 %, кількість нежиттєздатних складала 25 %, кількість пагонів становила в середньому 1,6 шт. з довжиною 3,6 см. Кількість вкорінених мікропагонів складала 62,7 %, 7,2 шт. на експлантат довжиною 1,7 см (рис. 4.18).



Рисунок 4.16. Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Мо 99 мкг/л в культурі *in vitro* (21 доба культивування)



Рисунок 4.17 – Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС з Мо 198 мкг/л в культурі *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система.



Рисунок 4.18 – Рослини–регенеранти хмелю сорту Кумир на середовищі МС без додавання Мо в культурі *in vitro* (21 доба культивування): А) мікропагони; Б) коренева система.

Отже, аналізуючи дані результатів таблиць приходимо до висновку, що найкраще себе проявили експлантати хмелю сорту Кумир на середовищі з Mg 36 мг/л (7 Варіант). Рослини–регенеранти тут були насиченого зеленого забарвлення, без деформацій листової пластинки. В середньому кількість утворених пагонів відповідала 1,8 шт. на експлантат довжиною 4,9 см, кількість міжвузль становила 4,4 шт; середня кількість коренів – 7,5 шт. довжиною 2,8 см (укорінення рослин при цьому становило 100 %). На середовищі без додавання Mg (15 Варіант) нежиттєздатних експлантатів становило 61,25 %, деформованих – 38,7 %, лише 37,5 % – життєздатних.

При цьому на 14 добу подвійна доза мікроелемента викликала у рослин хлорози і скручування листків. Аналогічний ефект був отриманий нами за умов збільшення вмісту наночастинок Mo (0,02 мг/л). Дослідження ризогенезу показали, що за умов заміщення солей металів наночастинками, у експлантатів збільшується загальна площа всмоктуючої поверхні кореня (рис. 4.19).

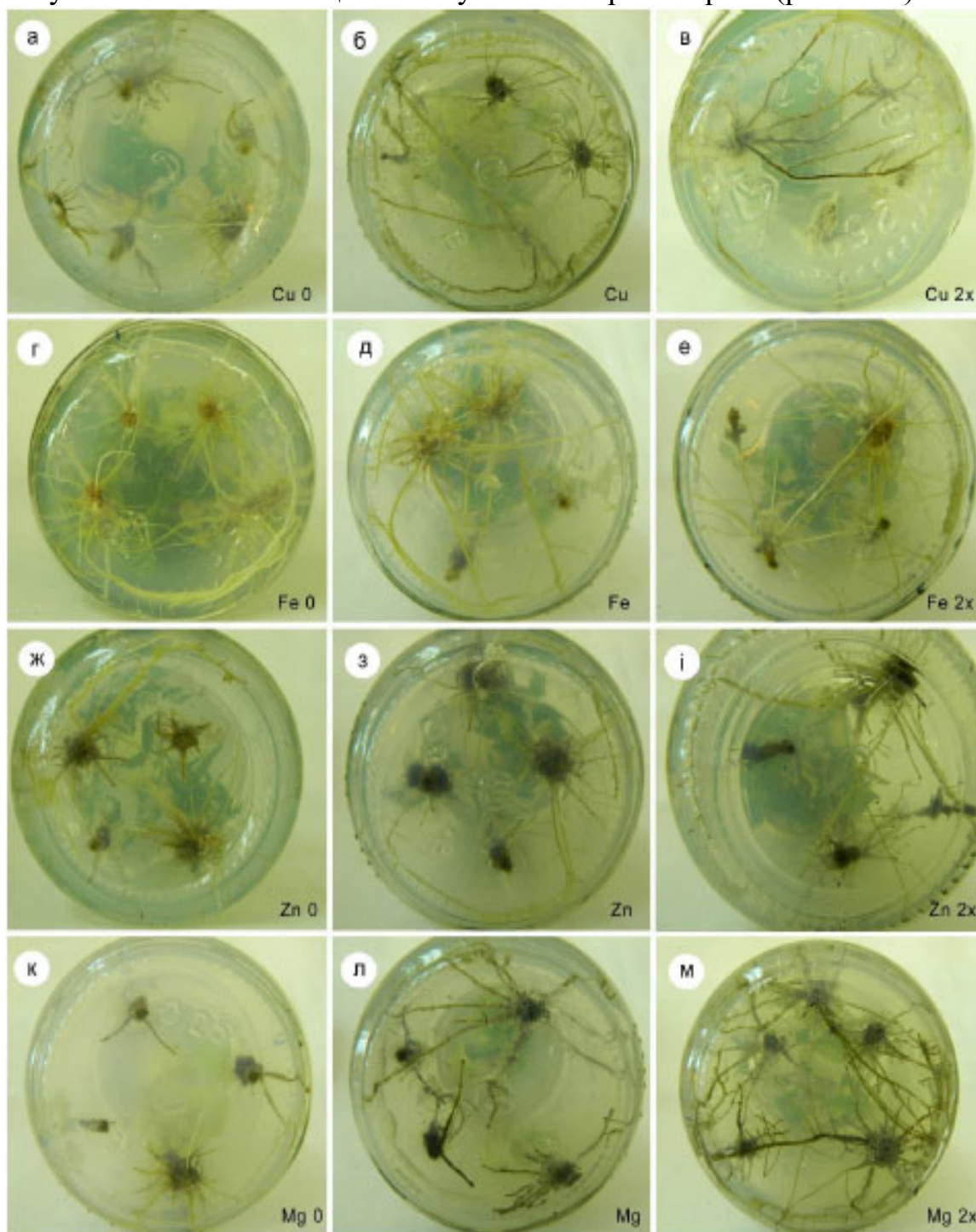


Рисунок 4.19. Вплив нанорозмірних частинок металів на формування кореневої системи хмелю сорту Кумир в культурі *in vitro*



Позитивний вплив на процеси ризогенезу виявлено за умов додавання у живильні середовища (ЖС) металевої форми цинку і заліза (рис. 4.20).

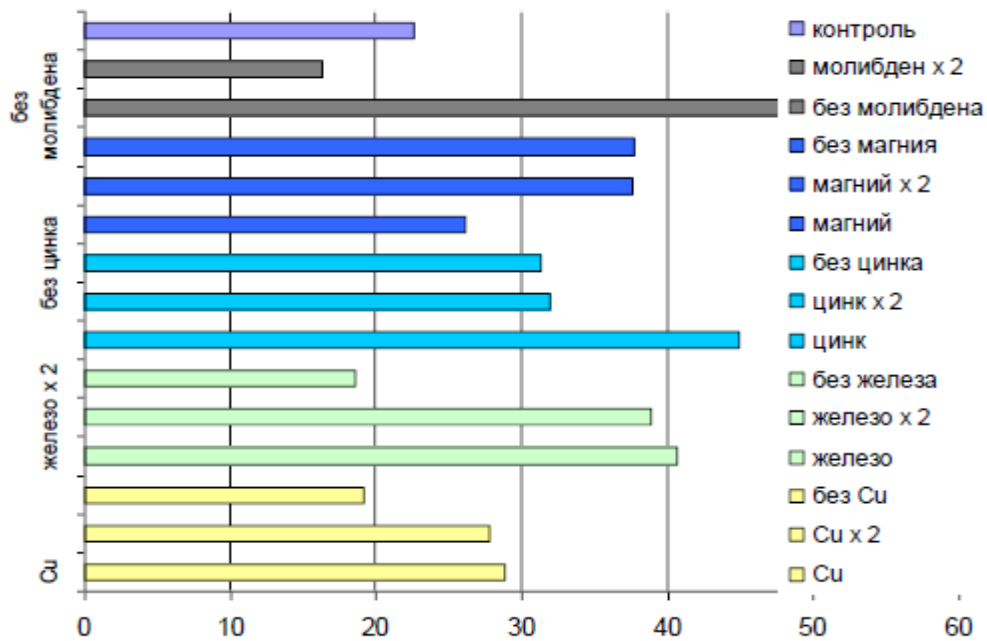


Рисунок 4.20. Довжина коренів хмелю за умов культивування рослин на модифікованих живильних середовищах

У ЖС з подвійною концентрацією Fe, Zn і Mg, на фоні збільшення вмісту фенолів, кількість і лінійні розміри корневих волосків помітно зменшувалися, що повинно враховуватися при оптимізації умов вирощування хмелю в культурі *in vitro* (рис. 4.21).

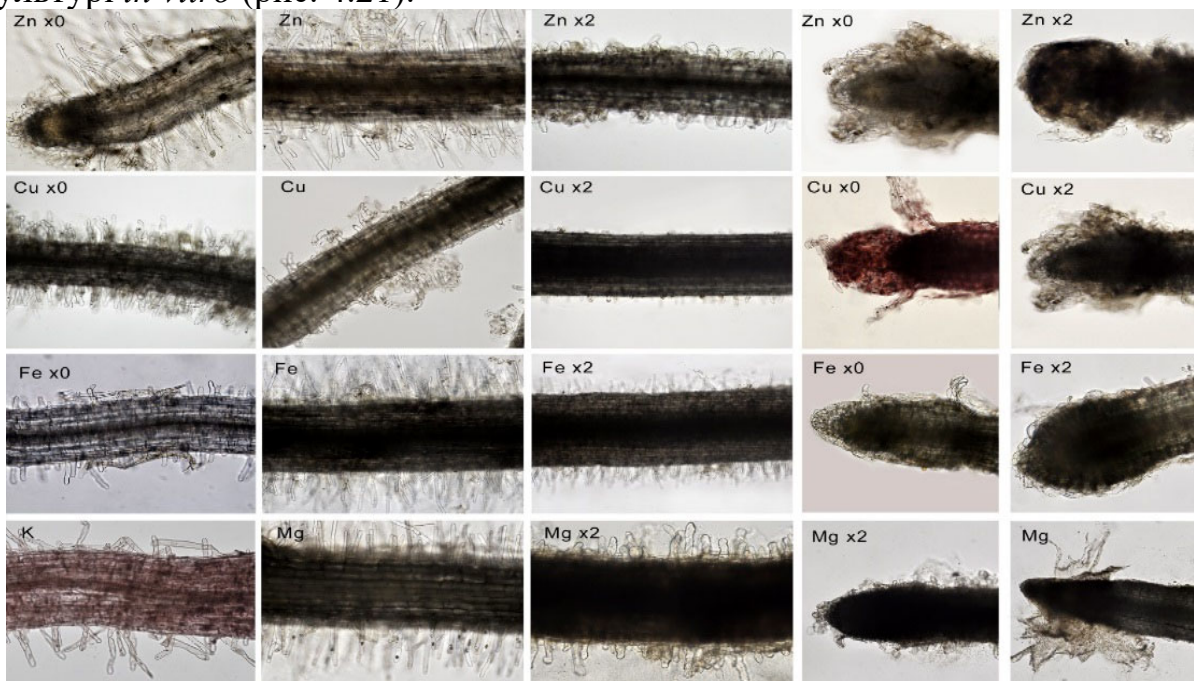


Рисунок 4.21. Вплив нанорозмірних частинок металів та дефіцит мікроелементів на формування корневих волосків хмелю сорту Кумир в культурі *in vitro*

Суттєве пригнічення росту коренів і активізація процесу злущування клітин епіблеми виявлено на фоні заміщення солей міді неіонною формою металу, який входить до складу металоензимів, оксидаз, у тому числі поліфенолоксидази. Гальмуюча дія нанорозмірних частинок на диференціацію і розтягнення клітин волосків значно посилювалась за умов збільшення концентрації металу. Функціонально це зменшує всмоктуючу поверхню кореня, погіршує живлення рослини і є вкрай небажаним для рослини симптомом. Слід також додати, що довжина і кількість кореневих волосків за умов збільшення вмісту нанорозмірних форм металів зменшувались в усіх варіантах складу живильного середовища. Також змінювалась форма кореневих волосків з типової сильновидовженої на округлу, у деяких випадках – сферичну. Гальмування процесів розтягування клітин, в основі якого лежить гормонально залежний процес, пов'язаний з підкисленням клітинних стінок на фоні збільшення осмотичного тиску в цитоплазмі, відбувається на рівні складної фізіологічної перебудови не тільки органу, але й всього організму. Тому з'ясування цих причин є вкрай складною для вирішення науковою проблемою.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено вплив нанорозмірних частинок біогенних мікроелементів на морфогенну на ризогенну активність рослин хмелю.

#### **4.4. Фізіологічні маркери оксидазного стресу у рослин хмелю в культурі *in vitro***

В умовах окислювального стресу цілісність внутрішньоклітинних структур підтримується антиоксидантною системою. Важливим компонентом цієї системи є мікроелементи, які входять до складу пептидів і білків. Одним з таких елементів є селен. Цей мікроелемент сприяє експресії генів, відповідальних за синтез СОД і глутатіонпероксидази. Він уповільнює пероксидацію ліпідів, а також старіння рослинного організму, стимулює ріст і сприяє вмісту хлорофілів у листках. У рослин селен входить до складу органічних сполук, зокрема селеноамінокислот і селенопротеїнів. Щодо синтезу фенольних сполук і впливу мікроелементу на активність оксидаз дані є досить обмеженими.

У діагностиці фізіологічної активності наноматеріалів селену визначення активності пероксидази та поліфенолоксидази в тканинах листків рослин на різних етапах органогенеза проводили в буферних розчинах (рН = 4,7; 6,7; 7,3) спектрофотометрично за Бояркіним.

У активації реакцій індукованої стійкості рослин важливу роль відіграє білок оксидазного стресу – пероксидаза. Її активність зростає при механічному пошкодженні тканин, зараженні за різних стресових умов [13, 21, 17]. Фермент здійснює полімеризацію коричневих спиртів у лігнін, формує міцні зшивки між целюлозою, пектином, глікопротеїнами клітинних стінок і лігніном, бере участь в загоєнні ран – відкладенні водонепроникного бар'єру з полімеризованих аліфатичних і ароматичних сполук (суберинізації тканини),

катаболізмі (розкладанні) ауксинів.

У процесі культивування рослин хмелю сорту Національний на модифікованих середовищах за додавання 0,1 мг/л селену характерним було збільшення активності ферментів: в 3–4 рази - поліфенолоксидази та в 2,5–3 рази – пероксидази. Важливою фізіологічною особливістю рослин хмелю, які були вирощені на модифікованих середовищах з додаванням 0,05 мг/л наноаквахелату селену, є незначне підвищення (1,25–1,5 рази) активності пероксидази і в 2,0–2,3 рази - поліфенолоксидази, що ймовірно пов'язано з активацією синтезу фенольних сполук, зокрема фенолкарбонових кислот.

Враховуючи це, модифіковані живильні середовища з додаванням наноаквахелатних форм селену можуть використовуватись для регуляції синтезу вторинних метаболітів, що вкрай важливо для оптимізації процедури введення рослин в культуру *in vitro*.

У процесах адаптації рослин до окислювального стресу важливу роль також виконують іони заліза. Особливості будови атома заліза, як типового перехідного метала, визначають його перемінну валентність ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) і здатність до комплексоутворення. В окислювально-відновних реакціях залізо задіяно як у гемових, так і негемових формах. У гемових формах залізо входить до складу цитохромів, а також ферментів класу оксидаз (пероксидаз, каталаз). У каталітичному циклі пероксидази беруть участь у відновленні пероксида водню через окислювання ендогенних молекул-донорів: фенольних сполук, зокрема компонентів лігніну.

У рослинних клітинах пероксидаза локалізована в різних компартментах і існує в декількох лізоформах:

- катіонні (рН 8,1 ... 11) – каталізують утворення пероксида водню з НАДН і води. Локалізовані в центральній вакуолі. Мають активність ІОК–оксидази і регулюють рівень ауксинів в клітині;
- слабоаніонні (рН 4,5 ... 6,5) – локалізовані в клітинних стінках. Помірно активні лігніфікатори, здійснюють суберинізацію ран;
- аніонні (рН 3,5 ... 4,0) – локалізовані в клітинних стінках. Здійснюють лігніфікації і зшивання полісахаридів клітинних стінок. Їх активність регулюється рівнем ауксинів.

Важливою фізіологічною особливістю рослин хмелю, які були вирощені на модифікованих живильних середовищах із додаванням нанопрепарату заліза було значне (в 3–4 рази, порівняно зі стандартним безгормональним середовищем, та в 4–5 разів, відповідно до середовища, яке не містило ферум–хелатного комплексу) збільшення активності пероксидази. У зв'язку з тим, що цей фермент відноситься до групи поліфункціональних ензимів, які активізуються в присутності іонів заліза.

У наших дослідженнях активність ферменту визначали в буферних розчинах (рН = 4,0; 6,5; 8,1). З огляду на те, що в експерименті рослини вирощувалися на слабкокислих середовищах (рН = 5,0–5,5) особливу роль у ферментативному каталізі продуктів метаболізму в клітинах, ймовірно,

належала насамперед слабоаніонним (кислим) пероксидазам. Це припущення знайшло своє підтвердження в експериментальних дослідженнях активності вільної та слабкозв'язаних форм пероксидази (табл. 4.17).

Таблиця 4.17

Активність вільної та слабко зв'язаної пероксидази в листках хмелю на живильних середовищах із різною формою та кількістю заліза

Склад живильного безгормонального середовища	Активність пероксидази (у.о. / г)		
	pH = 4,0	pH = 6,5	pH = 8,1
МС + Fe халат (стандарт)	5,47	3,4	2,3
МС (без заліза)	1,50	1,3	0,9
МС + Fe наноаквахелат 1:1	7,25	5,3	4,7
МС + Fe наноаквахелат 1:10	7,78	5,6	4,9

Спираючись на той факт, що пероксидаза відіграє важливу роль у окисненні ауксинів, а зв'язані з клітинними стінками пероксидази беруть участь у формуванні вторинних клітинних оболонок, вона виконує конституційну функцію. Активність ферменту та його ізоферментний склад мають прямий та опосередкований вплив на структурну анатомію вегетативних органів рослин, створює передумови для формування захисних тканинних бар'єрів. Використання наноаквахелатного комплексу в умовах *in vitro* підвищує активність пероксидаз, що свідчить про фізіологічну доступність мікроелементу для клітин. Враховуючи кислі властивості дослідженого нами препарату заліза, можна припустити, що його транспорт полегшується цитратними комплексами, які входять до його основи. У природних умовах збільшення рухомості іонів заліза в ґрунті забезпечується сидорофорами, які виділяються фізіологічно активними частинами коренів. Таким чином, наноаквахелатний комплекс заліза, разом з іншими мікроелементами, може розглядатись як абіогенний комплекс для синтезу слабкозв'язаних пероксидаз, відповідальних за регуляцію комплексних захисних реакцій рослин.

Рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за накопиченням продукту ПОЛ – малонового діальдегіду (МДА). Активація ПОЛ супроводжується окислювальною деструкцією ліпідів мембран і накопиченням продуктів окислення, які є реакційно активними по відношенню до макромолекул клітин. Гідропероксиди ліпідів здатні взаємодіяти з SH – групами білків, що може змінювати їх просторову структуру, знижувати, або повністю гальмувати активність ферментів. Накопичуючись пероксиди порушують цілісність мембран, впливають на їхню текучість. У подальшому перетворенні гідропероксиди перетворюються на альдегіди, які виявляють агресивно реакційну дію. Малоновий діальдегід може ковалентно зв'язуватись з аміногрупами білків, у тому числі

інтегральних. Утворюючи поперечні зшивки малонового альдегід порушує функцію мембранних білків, що знижує селективні властивості мембран, їх здатність до трансмембранного переносу молекул.

За отриманими результатами з'ясовано, що перекисне окислення ліпідів у листках хмелю посилюється за умов заміщення хелатної форми заліза на наночастинки заліза, а також солей міді на металеву мідь. Найактивніше процес окислювального руйнування ліпідів мембран відбувався за умов дефіциту кобальту і магнію. На фоні додавання подвійної дози металевої форми заліза інтенсивність ПОЛ знижувалась майже вчетверо (табл. 4.18).

Таблиця 4.18

Рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) за вмістом ТБКАП у листках хмелю за умов модифікації живильних середовищ нанорозмірними частинками металів

Склад ЖС	ТБКАП, мкмоль/г	Склад ЖС	ТБКАП, мкмоль/г	Склад ЖС	ТБКАП, мкмоль/г
Контроль	8,90 ±0,27	Контроль	8,90 ±0,27	Контроль	8,90 ±0,27
Mg	13,4 ±0,67	2 x Mg	11,7 ±0,59	без Mg	18,3 ±0,73
Fe	19,0 ±1,14	2 x Fe	4,90 ±0,25	без Fe	11,1 ±0,44
Zn	14,7 ±0,74	2 x Zn	11,4 ±0,46	без Zn	9,60 ±0,48
Cu	15,4 ±0,77	2 x Cu	13,9 ±0,70	без Cu	13,4 ±0,40
Co	13,7 ±0,69	2 x Co	13,7 ±0,41	без Co	16,1 ±0,64

#### 4.5. Особливості синтезу вторинних метаболітів рослин-регенерантів хмелю в умовах *in vitro*

Вплив на рослини і біодоступність мікроелементів у вигляді наночастинок відрізняється від іонних форм. Для дослідження особливостей дії наночастинок металів використовували колоїдні розчини металів, отримані плазменно-іскровим методом. Мікроелементи вносили в поживні середовища (MS) в кількостях, еквівалентних (Cu – мг / л, Fe – мг / л, Zn – мг / л, Mo – мг/л і Mg – мг / л) і таких, що двократно перевищують концентрації заміщаються солей. В якості модельних рослин використовували гіркий сорт хмелю української селекції Кумир. У процесі культивування хмелю на модифікованих живильних середовищах на 14, 21, 45 добу визначали морфометричні та фізіологічні параметри рослин: довжину коренів і корневих волосків, кількість міжвузлів, індукцію каллусогенезу, зміст пластідних пігментів, фенольних сполук і терпеноїдів.

При заміщенні в живильному середовищі хелатної форми заліза на еквівалентну кількість наночастинок металу, у тканинах листків на 20–30% збільшувався загальний вміст флавоноїдів, насамперед глікозидів кверцетину

і кемпферолу. Загальний же вміст фенолів при цьому зменшувалася. Подібний ефект був виявлений при використанні металевої міді і молібдену. Додавання у живильне середовище цинку сприяло підвищенню загального пулу фенольних речовин у тканинах листків, загальний пул яких, порівняно з контролем, збільшувалася в 1,3–1,4 рази (табл. 4.19).

Таблиця 4.19

Вміст та співвідношення фенольних сполук і флавоноїдів у листках хмелю сорту Кумир за умов культивування на модифікованих живильних середовищах

Модифікація ЖС	Фл, мг/г	Фн, мг/г	Фн К : Д	Фл К : Д	Фн : Фл
К	2,82 ±0,11	90,11 ±3,60	–	–	32,0
Mg	1,80 ±0,07	21,17 ±0,42	<b>4,26</b>	1,57	11,8
Fe	3,50 ±0,14	49,93 ±2,00	1,80	0,81	14,3
Zn	3,26 ±0,13	126,63 ±5,07	0,71	0,86	38,8
Cu	4,12 ±0,16	43,92 ±1,76	2,05	0,68	10,7
Mo	3,31 ±0,13	88,80 ±3,55	1,01	0,85	26,8
Mg x2	0,85 ±0,04	145,72 ±7,29	0,62	<b>3,32</b>	<b>171,4</b>
Fe x2	2,11 ±0,08	70,19 ±2,81	1,28	1,34	33,3
Zn x2	1,73 ±0,07	68,80 ±2,75	1,31	1,63	39,8
Cu x2	1,83 ±0,07	111,15 ±3,33	0,81	1,54	<b>60,7</b>
Mo x2	3,39 ±0,14	77,58 ±3,10	1,16	0,83	22,9
Fe + Mg	3,21 ±0,13	54,59 ±2,18	1,65	0,88	17,0
Fe + Cu	1,54 ±0,06	50,60 ±2,02	1,78	1,84	32,9
Fe + Cu + Zn	0,97 ±0,04	30,78 ±1,23	2,93	2,92	31,7

Примітка: ЖС – живильне середовище, Фл – флавоноїди, Фн – феноли, К – контроль, Д – дослід

Крім цього, в тканинах рослин-регенерантів хмелю виявилися інші істотні перебудови у вторинному метаболізмі. Так, біохімічне профілювання вторинних метаболітів методом ТШХ дозволило виявити в листках хмелю активацію синтезу терпеноїдних сполук ( $R_f \sim 0.32-0.45$ ).

Фенольні сполуки виконують різноманітні функції у рослинному організмі [4, 5]. Продукти окислення фенольних спиртів (кумарилового,



коніферилового, сінапілового), конденсовані в результаті вільнорадикальних реакцій, утворюють аморфний тривимірний полімер лігнін, що відкладається в клітинних стінках (зазвичай у вторинних стінках і стінках мертвих клітин). Фенолкабонові кислоти і флавоноїди активно синтезуються у тканинах листків хмелю. Біохімічний аналіз показав, що за складом фенольних сполук гіркі та ароматичні сорти відрізняються у першу чергу співвідношення глікозидів кверцетину.

Порівняльна оцінка флавоноїдного комплексу дозволяє отримати загальну уяву щодо характеру синтетичних процесів у ароматичних (Національний) і гірких сортів хмелю (Нагет, Ньюпорт). У наших попередніх дослідженнях було показано, що у листках хмелю синтез продуктів вторинного метаболізму має сортоспецифічний характер, проте залежить від умов вирощування рослин, фенофази і ярусу вегетативних органів, наявності інфекційних процесів та інвазій. У культурі *in vitro* на модифікованих живильних середовищах якісний склад флавоноїдів у листках хмелю виявився достатньо лабільним.

На стандартному і модифікованих живильних середовищах МС методом ТШХ виявлено понад десять фенольних сполук, флавоноїдів включно. Встановлено, що за умов дефіциту заліза в листках хмелю активно накопичуються два флавоноїда ( $R_f \sim 0,4$  і  $0,60$ ) (табл. 4.20).

Таблиця 4.20

Показники  $R_f$  флавоноїдів хмелю, що вирощувалась на модифікованих живильних середовищах із додаванням різних халатних форм заліза

Варіант	Значення $R_f$					
МС	0,22	0,31	0,4	0,57	0,6	0,8
МС – Fe	0,22	–	0,4	–	0,6	–
МС + NHF (28,0 мг/л)	0,22	–	0,4	–	0,6	0,8
МС + NHF (2,8 мг/л)	0,22	–	0,4	–	0,6	0,8
Стандарт (рутин)			0,52			

Синтез цих фенольних сполук, які за положенням на хроматограмі є середньо– та високополярними речовинами, може бути пов'язаний з регуляторною і антиоксидантною функціями, яку флавоноїди виконують в стресових умовах. За додавання у середовище еквівалентної концентрації NHF кількість глікозидів зменшується, проте збільшується загальний пул флавоноїдів з меншим показником полярності ( $R_f \sim 0,80$ ), який є характерним і для культивування рослин на базовому середовищі МС. За умов зменшення концентрації NHF (2,8 мг/л) кількість флавоноїдів ( $R_f \sim 0,60$  і  $0,80$ ) за даними фотоденситометрії збільшується.

Додавання до середовища нанорозмірних частинок суттєво вплинуло на синтез і накопичення пластидних пігментів у листках хмелю. Встановлено, що найбільший позитивний вплив на цей процес виявили наночастинки міді. Магній, який є складовою молекули хлорофілу, у використаній нами формі, вірогідно, є фізіологічно малодоступним для рослин хмелю. Збільшення концентрації металу у живильному середовищі удвічі, лише незначно покращило стан рослин за показниками вмісту хлорофілів а і b. Позитивний ефект було отримано за умов одночасного використання наночасток заліза і магнія. Сумісна дія металів і їх вплив на процеси синтезу фотосинтезуючих пігментів є адитивною. Водночас, слід зауважити, що у наноконкомплексі з двох металів вагомий вклад в оптимізацію загального стану рослин належить залізу. Навпаки, сумісний вплив заліза і міді на рослини, викликає протилежний ефект. Одночасне застосування трьох металів (заліза, міді та цинку) негативно впливає на вміст фотосинтезуючих пігментів і не може застосовуватись для мікроклонального розмноження хмелю. Найменшу чутливість до подвійного збільшення концентрації металу в складі живильного середовища було виявлено для молібдену (рис. 4.22).

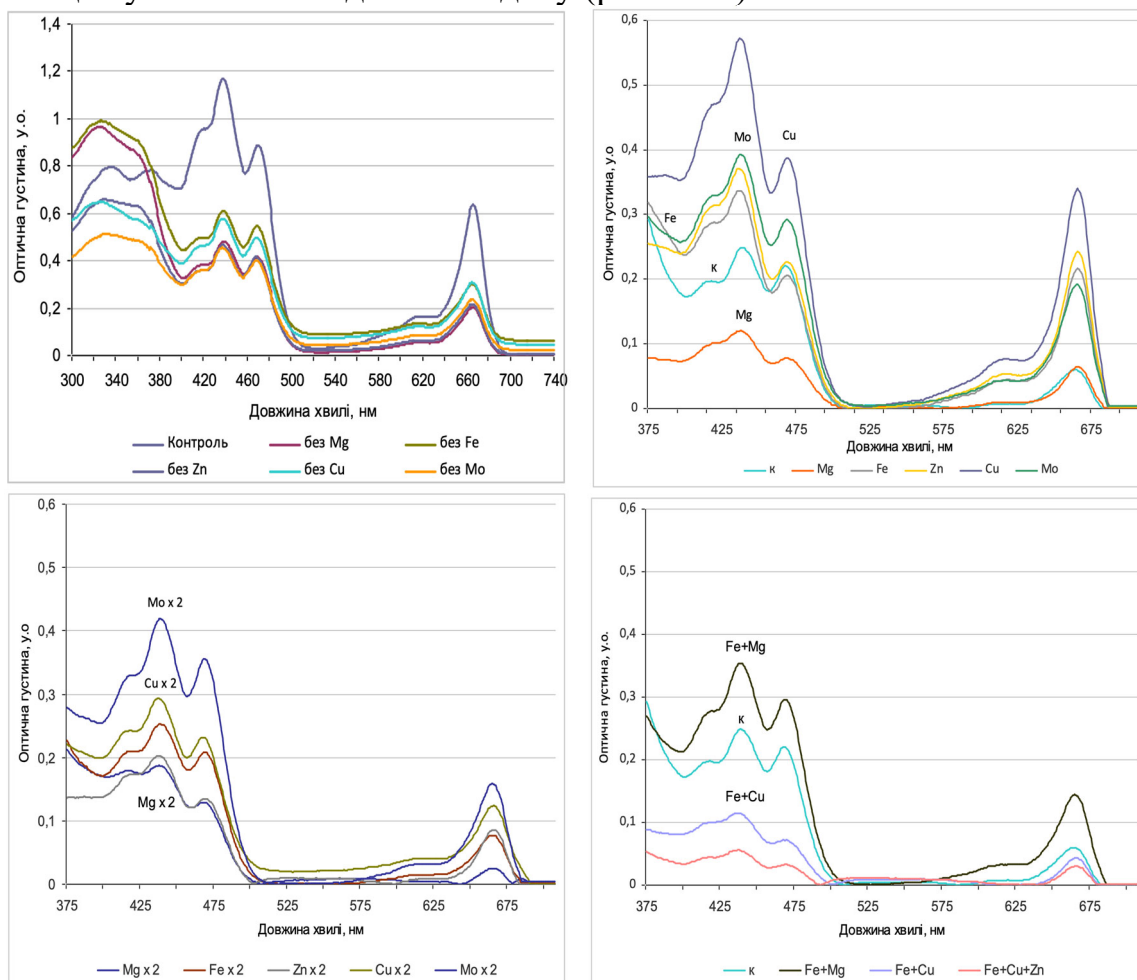


Рисунок 4.22. Електронні спектри екстрактів листків хмелю за умов культивування на модифікованих живильних середовищах *in vitro*

Дефіцит мікроелементів призводив до суттєвого зниження у листках показників вмісту хлорофілу а. За результатами наших досліджень за ступенем залежності концентрації пігменту від дефіциту мікроелементів останні можна розташувати у порядку збільшення хлорофілу наступним чином: Mg > Zn > Co > Fe > Cu; за збільшенням концентрації каротиноїдів: Co > Zn > Cu > Mg > Fe (табл. 4.21).

Таблиця 4.21

Вміст і співвідношення пластидних пігментів у листках хмелю звичайного за умов дефіциту мікроелементів

Пігменти	Контроль	Дефіцит мікроелементу				
		– Mg	– Fe	– Zn	– Cu	– Co
Хл а	5,6 ±0,28	1,8 ±0,09	2,7 ±0,14	2,0 ±0,10	2,8 ±0,14	2,1 ±0,11
Хл б	2,3 ±0,12	1,0 ±0,05	2,4 ±0,12	1,2 ±0,06	2,1 ±0,11	1,5 ±0,08
Хл а + Хл б	7,9 ±0,40	2,8 ±0,14	5,1 ±0,25	3,2 ±0,16	4,9 ±0,24	3,6 ±0,18
а/б	2,4 ±0,12	1,8 ±0,09	1,1 ±0,06	1,6 ±0,08	1,3 ±0,07	1,4 ±0,07
к	3,3 ±0,16	1,5 ±0,07	1,5 ±0,06	1,3 ±0,07	1,4 ±0,07	1,1 ±0,06

Фізіологічне підґрунтя означеного порядку полягає у прямому та опосередкованому впливі кожного металу в синтезі зеленого пігменту. Так, магній входить до складу металопорфірину хлорофіла, мідь – до складу пластоціаніну, мономерного білка, який забезпечує перенос електронів від фотосистеми II до фотосистеми I, залізо і цинк – до складу металоферментів, які беруть участь у синтезі хлорофілів.

Отже, експериментально підтверджено і показано, що атоми наночастинок металів є фізіологічно доступними, здатними створювати металоферментні комплекси, зокрема пероксидази. Тому вважаємо за доцільне продовжити дослідження у цьому напрямку для з'ясування потенційних можливостей нових форм мікроелементів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Бобер А.В. Порівняльна оцінка пивоварних якостей шишок та гранул хмелю тип 90 ароматичних і гірких сортів за вмістом гірких речовин / А.В. Бобер // Наукові доповіді НУБіП. К., 2011., № 4. [електронний ресурс] // Режим доступу: <http://nd.nauu.kiev.ua>.
2. Григорюк І. П. Технологія мікроклонального розмноження рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.), стійких проти каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic): науково-методичні рекомендації / Григорюк І. П., Костенко С.М., Оверченко О.В., Пентелюк О.С., Ключаденко А. А., Ліханов А. Ф. К., 2017. 71 с.
3. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2013 р. К.: Алефа, 2013. 464 с.
4. Едрева А. М. Феніламіди в рослинах. / Едрева А. М., Беликова В. Б., Цонев Т. Д. Физиология растений. 2007. Т. 54, № 3. С. 325–341.
5. Екологічна біохімія: навч. посібник / В. М. Ісаєнко та ін. Київ: Видавн. центр НАУ, 2005. С. 72–84.
6. Зінченко О.І. Рослинництво. / Зінченко О.І., Салатенко В.М., Білоножко М.А.. К.: «Аграрна освіта», 2001. 592 с.
7. Каленська С.М. Системи сучасних інтенсивних технологій у рослинництві. / Каленська С.М., Єрмакова Л.М., Паламарчук В. Д., Поліщук І.С. Підручник. Вінниця: ФОП Рогальська І.О., 2015. 448 с.
8. Класифікатор господарсько-цінних ознак хмелю (*Humulus lupulus* L.) / І.П. Штанько, О.В. Гладких, Т. І. Козлик, О. Л. Дзядович, Г.В. Пермякова. / Інститут сільського господарства Полісся НААН 2015. 24 с.
9. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. / Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Киев: Наукова думка, 2005. 270 с.
10. Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур. 120 культур: навч. посіб. 4-е вид. В.В. Лихочвор, В.Ф. Петриченко. Львів: НВФ «Українські технології», 2014. 1040 с.
11. Ліпкан Г.М. Хміль звичайний – лікарська та харчова рослина // Фітотерапія в Україні. 2000. № 3–4. С. 37–40.
12. Ліханов А.Ф. Антимікробна активність вторинних метаболітів перикарпіїв деяких видів деревних рослин. / Ліханов А.Ф., Білоус С. Ю., Бородай В. В. Лісове і садово-паркове господарство. 2019. № 15. 13 с.
13. Ліханов А. Ф. Вплив оксикоричних і оксibenзойних кислот на синтез пластидних пігментів і фенольних сполук у листках винограду (*Vitis vinifera*) in vitro. / Ліханов А. Ф., Серета О. В., Кляченко О. Л., Мельничук М. Д. Физиология растений и генетика. 2018. Т. 50, № 4, С. 331–343.
14. Ляшенко Н. И. Биохимия хмеля и хмелепродуктов. Житомир: Полісся, 2002. С. 90-66.
15. Ляшенко Н.И. Физиология и биохимия хмеля / Н.И. Ляшенко, Н.Г. Михайлов, Р.И. Рудык. Житомир: Полісся, 2004. 408 с.

16. Мазур В. А., Паламарчук В. Д., Поліщук І.С. Новітні агротехнології у 343 рослинництві. Вінниця. 2017. 588 с.

17. Матвеева Т. В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. / Матвеева Т. В., Павлова О. А., Богомаз Д. И., Демкович А. Е., Лутова Л. А. Экологическая генетика. 2011. Т. 9(1). С. 32–43.

18. Мельничук М. Влияние вирусной инфекции на цитогистологическое состояние хмеля (*Humulus lupulus* L.). / Мельничук М., Лиханов А., Григорюк И., Антипов И., Оверченко В., Шульга, В., Ключададенко А. Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Серия: Биология. 2012. № 62. С. 64–69. ботаничний журнал. 2013. Т. 70. № 3. С. 342–350.

19. Мельничук М. Д. Будова, розвиток і функції секреторної системи *Humulus lupulus* (Cannabaceae). / Мельничук М. Д., Якубенко Б. Є., Ліханов А. Ф. Український

20. Мельничук М. Д. ДНК-ідентифікація генотипів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) на основі SSR-маркерів (Методичні рекомендації) / Мельничук М. Д., В. В. Оверченко, В. Г. Спиридонов, Ф. М. Парій. К.: Видавничий центр НАУ. 2008. 26 с.

21. Олійник О. О. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на метаболізм та регенераційні процеси в експлантатах троянди ефіроолійної у культурі *in vitro*. / Олійник О. О., Ліханов А. Ф., Мельничук М. Д. Біологічні системи. 2017. Т.9. Вип. 1. С. 33–38.

22. Паламарчук В.Д. Еколого-біологічні та технологічні принципи вирощування польових культур: Навчальний посібник / Паламарчук В.Д., Климчук О.В., Поіщук І.С., Колісник О.М., Борівський А.Ф. Вінниця: ФОП Данилюк, 2010. 636 с.

23. Савченко Ю.І. Українські сорти хмелю – основа для виробництва вітчизняного пива / Ю.І. Савченко, В.В. Шабликін, І.П. Штанько та ін. // Науково-виробничий щорічник «Посібник українського хлібороба 2010», м. Харків. 2010. С. 197.

24. Чирва О. Український хміль повертатиме втрачені позиції / О. Чирва // Газета «Тиждень». № 2. 2007. С. 5.

25. Якубенко Б.Є. Ботаніка. Підручник. / Б.Є. Якубенко, І.М. Алейніков, С.І. Шабарова, С.П. Машковська. Київ : Видавництво Ліра-К, 2018. 436 с.

26. Якубенко Б.Є. Польовий практикум з ботаніки / Б.Є. Якубенко. 3-є видання, перероблене та доповнене. К. : Фітосоціоцентр, 2012. 400 с.

27. Likhanov A., Melnychuk M., Kliuvadenko A. Parthenogenesis and its role in increasing the capacity of hop (*Humulus lupulus* L.). Proceedings of the Scientific Commission: St. Stefan am Walde, Austria 25–29 June 2017. P. 105-107.

28. Свідоцтво № 0438 про авторство на сорт рослин Національний. Хміль (*Humulus lupulus* L.) / М.Д. Мельничук, М.Й. Заграфова. Заявка № 03021003. Держреєстрація 26 грудня 2003 р.

## Розділ 5

### ФЕНОЛКАРБОНОВІ КИСЛОТИ І ЇХ РОЛЬ У ПРОЦЕСІ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИН ЗА УМОВ *IN VITRO*

Листки більшості ягідних культур, а саме суниці садової (*Fragaria ananassa*), малини (*Rubus idaeus* L), смородини (*Ribes nigrum* L), винограду (*Vitis vinifera*) містять значну кількість різноманітних фенольних сполук, які здатні мобілізувати захисні механізми проти патогенних організмів і вірусів [1]. Фенольні сполуки є важливими елементами у системі природних механізмів стійкості організмів проти стресових негативних чинників, ефекторами в реакціях індукованої резистентності [4, 5; 10]. Концентрація фенольних сполук в рослині широко варіюється протягом життєвого циклу, а також є різною в різних органах та тканинах [2].

Фенольні кислоти з о–дифенольною структурою здатні утворювати хелати з іонами металів, що має важливе значення для функціонування біологічних систем. Крім того, вони легко окислюються до відповідних хінонів, що призводить до утворення окисно–відновних систем і дозволяє полімеризувати високомолекулярні компоненти.

Фенолкарбоніві кислоти розділяють на два класи: похідні бензойної кислоти, такі як галова, саліцилова, протокатехова і похідні коричної кислоти, такі як кумарова, сінапова, кавова і ферулова. Кавова кислота є найрозповсюдженішою фенольною кислотою, міститься у багатьох фруктах і овочах, здатна етерифікуватись з хінною кислотою, з утворенням хлорогенової кислоти, яка є основною фенольною сполукою у каві. Іншою поширеною фенольною кислотою є ферулова, яка присутня у злаках і етерифікується та входить до складу геміцелюлози в клітинній стінці .

Оксикоричні кислоти беруть активну участь в обміні речовин і є біогенетичними попередниками переважної більшості інших фенольних сполук. У рослин оксикоричні кислоти також представлені у вигляді ефірів або полімерів. найвідомішим з них є куркумін, що складається з двох молекул ферулової кислоти. Оксикоричні кислоти можуть також виникати у тканинах ряду тварин в процесі метаболізму поліфенолів.

Біосинтез фенольних сполук впливає із шикіматного шляху синтезу. Він поєднаний з синтезом індолів, деяких алкалоїдів та беталаїнів. Попередником похідних коричної кислоти і флавоноїдів є фенілаланін, який під дією ключового ферменту цієї частини шляху біосинтезу фенілаланін–аміак–ліази (ФАЛ) перетворюється в коричні кислоти. Корична кислота в свою чергу також виступає попередником синтезу полімерів, таких як лігнін, які синтезуються з коричних альдегідів і відповідних спиртів – монолігнолів.

Флавоноїди і стилбени (резвератрол, виділений з винограду) також формуються цим шляхом біосинтезу. Активація коензиму–А відіграє важливу роль в мережі біосинтезу, корична кислота активується, утворюючи з коферментом А ефіри, які є попередниками синтезу флавоноїдів і кумаринів [3].



Основні властивості природних фенольних сполук можна розділити на три групи: фізичні, хімічні та біологічні. До фізичних властивостей фенольних сполук відносяться здатність надавати колір, смак і запах, а також поглинати ультрафіолетове світло. До хімічних властивостей належать антиоксидантна, радикал зв'язувальна та комплексоутворювальна. Використовуючи ці властивості, фенольні сполуки здатні гасити окислювальний «вибух», нейтралізувати активні радикали і виводити з організму важкі метали та радіоактивні елементи, тобто захищати рослини і живі організми від дії несприятливих чинників. Біологічні властивості мають дуже широкий спектр застосування, зокрема рістрегулююча здатність у процесах росту, коренеутворення та дозрівання плодів.

### **5.1. Особливості впливу оксикоричних і оксибензойних кислот на вміст пластидних пігментів та фенольних сполук за умов вирощування рослин *in vitro***

В експерименті з модифікації базового складу живильного середовища оксибензойними і оксикоричними кислотами було з'ясовано, що фенольні сполуки навіть у мілімолярних концентраціях здатні суттєво впливати на синтез пластидних пігментів (хлорофілів і каротиноїдів) [7].

За результатами досліджень під дією оксибензойних і оксикоричних кислот у листках модельних рослин змінювався склад допоміжних пігментів групи каротинів і ксантофілів. Електромагнітні спектри щодо абсорбції енергії світла в різних видів рослин дещо вирізнялись. Так, у рослин малини звичайної *Rubus idaeus* L. в контролі на спектрограмі виявлено максимуми абсорбції у синій області спектра – 470, 440 і 420 нм, що відповідає епоксидпохідному класу ксантофілів – віолоксантину, який за умов розсіяного світла виконує функцію накопичення енергії, та в червоній – 665, 619 і 540 нм, характерній для хлорофілів. За умов культивування рослин–регенерантів *Rubus idaeus* на живильному середовищі з додаванням ванілінової, сирінгової, кавової і ферулової кислот (1 мМ) у спектрах поглинання метанольних екстрактів листків виявлено піки з іншими максимумами: III пік ( $\lambda_{\max} = 469$  нм), II пік ( $\lambda_{\max} = 437$  нм) і I пік ( $\lambda_{\max} = 417$  нм), які відповідали спектральним характеристикам іншому епоксидпохідному ксантофілу – неоксантину. Неоксантин утворюється з віолоксантину під дією ферменту неоксантинсинтази. Цис–форма цього пігменту є проміжним продуктом у синтезі абсцизової кислоти, яка в стресових умовах активно утворюється з ксантоксину за участю 9–цис–епоксикаротеноїд–діоксигенази (NCED). Співвідношення показників абсорбції за максимумами поглинання світла між піками III ( $\lambda_{\max} = 470$  нм) і II ( $\lambda_{\max} = 440$  нм) в контролі становило – 30–31 %. За умов додавання до складу живильного середовища ферулової кислоти ці співвідношення змінилися і різниця між піками III ( $\lambda_{\max} = 469$  нм) і II ( $\lambda_{\max} = 437$  нм) становила – 13,0–14,0 %. Отже, оксикорична кислота з однією метоксигрупою в 3 положенні й гідроксигрупою в 4 положенні (3–метокси–4–

гидроксикорична кислота) впливала на якісний склад пластидних пігментів і корегувала їх синтез відповідно до стресових умов. Цей процес у рослин *Rubus idaeus* відбувався на фоні значного зниження кількості хлорофілів у листках. Безумовно, що спектральне профілювання метанольних екстрактів листків без необхідного доочищення елюентів і виділення каротиноїдів у чистому вигляді дає досить приблизну оцінку якісного складу пігментів, утім, для експрес аналізу пігментного комплексу виявляється досить інформативним. Гіпсохромний зсув максимуму I піка в області, ближче до ультрафіолету, може бути пов'язаний зі збільшенням у загальному пулі ксантофілів частки цис-ізомерів. За інтенсивністю абсорбції світла близькими до контролю були екстракти листків рослин, що культивувались на живильному середовищі з додаванням сирінгової кислоти. Слід зазначити, що за умов додавання всіх кислот ефект пригнічення синтезу фотосинтетичних пігментів нівелювався.

Аналогічний ефект був виявлений і в рослин *Ribes nigrum* L. Екстракти листків цієї модельної рослини в контролі та за умов додавання до складу живильного середовища ванілінової кислоти показали характерні для неоксантину максимуми поглинання в синій і фіолетовій частинах спектру – 469, 437, 416 нм, що свідчить про успішну адаптацію рослин-регенерантів до умов нестачі світла. Під впливом ванілінової, кавової і ферулової кислот спостерігалось пригнічення синтезу фотосинтетичних пігментів. Цей факт свідчить про те, що в рослинному організмі оксикоричні і оксибензойні кислоти в кількостях, що співвідносяться з основними фітогормонами, знаходяться в певній збалансованості і створюють динамічно врівноважену систему фітохімічного контролю одного з елементів гомеостазу. За умов підвищення або зниження концентрації одного з фенольних компонентів система здатна виходити з рівноваги і компенсувати зовнішню або внутрішню причину через активацію синтезу тих сполук, які внесені до метаболічних ланцюгів компенсаторних реакцій.

Наявність у структурі молекул коричних і бензойних кислот окси- та метоксигруп, їх кількість та положення суттєво впливає на їхню біологічну активність. Суттєве значення також має видова і сортова специфічність вторинного метаболізму, накопичення тих або інших фенолів та їх кон'югатів. Отже, вплив фенольних екзометаболітів, що надходять до рослинних тканин з живильного середовища, може значно вирізнитись [6]. Так, на відміну від рослин малини і смородини, всі без винятку досліджувані фенольні кислоти істотно пригнічували синтез пластидних пігментів у *Fragaria ananassa* [2]. Основні піки поглинання були подібними: II пік – 437 нм і III – 469 нм. Вирізнявся лише I пік, який в контролі мав показники  $\lambda_{\max} = 415$  нм, а за умов додавання фенольних кислот –  $\lambda_{\max} = 417$  нм. Доказом високої специфічності впливу фенольних кислот на синтез пігментів є реакції на них рослин-регенерантів *Vitis vinifera* сорту Геркулес. Експериментально доведено, що значну чутливість рослини цього сорту мають до ферулової кислоти, яка стимулювала синтез каротиноїдів. Водночас суттєво посилювалась

абсорбційна здатність спиртових екстрактів поглинати світло в синьому спектрі –  $\lambda_{\max} = 411$  нм, у жовтому й оранжевому спектрах із максимумами поглинання  $\lambda_{\max} = 537$  нм і  $\lambda_{\max} = 607$  нм. У контролі та в рослин на живильному середовищі з іншими фенольними кислотами максимумами поглинання електромагнітної енергії в синій і фіолетовій частинах спектру були – 470, 445, 418 нм, що може пояснюватися накопиченням у листках  $\alpha$ -каротину та лютеїну. Показано значну варіабельність впливу фенольних кислот на пігментний комплекс досліджуваних нами рослин. Висока рістстимулювальна активність ванілінової кислоти, що обумовлена наявністю метоксигрупи у 3 положенні стосовно показників вмісту пластидних пігментів виявила протилежний – пригнічувальний ефект. Стимулювання процесу синтезу хлорофілу *a* показала сирінгова кислота, у структурі якої є дві 3,5-метоксигрупи (рис. 5.1, б).

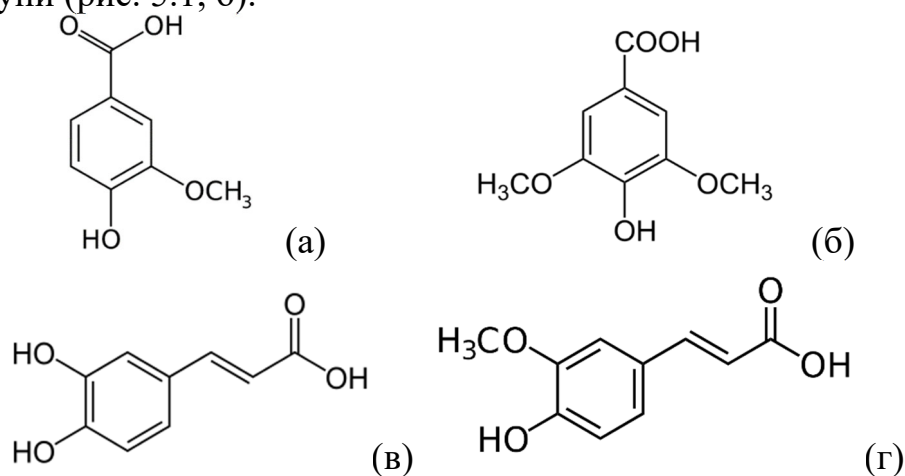


Рисунок 5.1. Формули оксibenзойних: а – ванілінова (4-гідрокси-3-метоксибензойна кислота), б – сирінгова (4-гідрокси-3,5-диметоксибензойна кислота) і оксикоричних: в – кавова (3,4-діоксикорична кислота), г – ферулова (3-метокси-4-гідроксикорична кислота) кислоти

Наявність однієї 3-метоксигрупи (рис. 5.1, г), що входить до складу ферулової кислоти, в рослинах малини (*Rubus idaeus*) і смородини чорної (*Ribes nigrum*) призводить до повільного пригнічення синтезу хлорофілів, а в листках винограду (*Vitis vinifera*), навпаки, – активно його стимулює. За додавання фенольних кислот до складу живильного середовища індивідуально спостерігалось зменшення вмісту каротиноїдів у листках *Ribes nigrum*.

За використання комплексу кислот вміст пластидних пігментів зростав. Кавова і ферулова кислоти при цьому були слабо нейтральними, або виявляли пригнічувальну дію (табл. 5.1).

Введення кавової кислоти до складу живильного середовища пригнічувало фенілпропаноїдний синтез, а також накопичення у листках флавоноїдів і катехінів у рослин-регенерантів *Rubus idaeus*.

На рослини *Ribes nigrum* ця оксикорична кислота діяла інакше. Вона досить активно стимулювала фенілпропаноїдний синтез, проте повільно

впливала на синтез флавоноїдів і катехинів. Комплексне застосування фенольних кислот сприяло нагромадженню в листках *Rubus idaeus* загальних фенолів.

Таблиця 5.1

Вплив оксикоричних кислот на вміст і співвідношення пластидних пігментів у листках рослин ягідних культур ( $x \pm SE$ ;  $n = 4$ )

Культура	Кис- лоти	Хлорофіл, мг·г <sup>-1</sup>				Кар*, мг·г <sup>-1</sup>	Хл. a + Кр
		a	b	a + b	a/b		
<i>Rubus idaeus</i>	К*	3,03 ±0,09	1,54 ±0,03	4,56 ±0,09	1,97	1,81 ±0,04	2,53
	Фе	2,58 ±0,08	0,99 ±0,02	3,58 ±0,07	2,60	1,03 ±0,02	3,48
	Кв	2,11 ±0,06	0,84 ±0,01	2,95 ±0,06	2,52	0,68 ±0,01	4,35
	Сн	3,77 ±0,11	1,41 ±0,04	5,18 ±0,10	2,67	1,49 ±0,03	3,47
	Су	2,85 ±0,08	1,08 ±0,02	3,93 ±0,08	2,65	1,29 ±0,02	3,04
НІР <sub>0,05</sub>		0,14	0,06	0,20	0,12	0,06	0,17
<i>Ribes nigrum</i>	К	2,88 ±0,09	1,11 ±0,03	3,98 ±0,08	2,60	1,16 ±0,06	3,44
	Вн	1,80 ±0,07	0,68 ±0,02	2,47 ±0,05	2,66	0,76 ±0,01	3,27
	Фе	1,59 ±0,05	0,59 ±0,01	2,18 ±0,04	2,71	0,66 ±0,02	3,29
	Кв	2,44 ±0,08	0,92 ±0,04	3,35 ±0,07	2,65	0,95 ±0,04	3,52
	Сн	2,19 ±0,07	0,82 ±0,02	3,01 ±0,06	2,66	0,89 ±0,03	3,38
	Су	2,97 ±0,09	1,12 ±0,03	4,09 ±0,08	2,64	1,20 ±0,02	3,41
НІР <sub>0,05</sub>		0,12	0,04	0,16	0,13	0,05	0,17
<i>Vitis vinifera</i>	К	0,17 ±0,01	0,11 ±0,01	0,28 ±0,01	1,53	0,59 ±0,01	0,47
	Вн	0,42 ±0,02	0,28 ±0,01	0,70 ±0,03	1,47	1,11 ±0,06	0,63
	Фе	1,90 ±0,06	0,29 ±0,02	2,19 ±0,09	6,52	0,91 ±0,04	2,42
	Кв	0,62 ±0,03	0,37 ±0,02	1,00 ±0,03	1,67	0,94 ±0,05	1,07
	Сн	0,44 ±0,02	0,21 ±0,01	0,65 ±0,01	2,09	0,94 ±0,05	0,69
	Су	0,74 ±0,04	0,55 ±0,03	1,29 ±0,02	1,35	1,07 ±0,06	1,21
НІР <sub>0,05</sub>		0,04	0,02	0,06	0,12	0,05	0,05

\* Примітка. Кр – каротиноїди, К – контроль; оксикоричні кислоти: Вн – ванілінова, Фе – ферулова, Кв – кавова, Сн – сирінгова, Су – сума всіх кислот

Ванілінова кислота стимулювала синтез каротиноїдів у листках смородини чорної. Наявність додаткової метоксигрупи в молекулі сирінгової

кислоти значно ослаблювала стимулювальну дію оксibenзойної кислоти (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Вплив оксикоричних кислот на вміст і співвідношення вторинних метаболітів у листках рослин *in vitro* ( $x \pm SE$ ;  $n = 4$ )

Культура	Кислоти	Феноли, мг·г <sup>-1</sup>	Флавоноїди, мг·г <sup>-1</sup>	Співвідношення феноли / флавоноїди	Катехіни, мг·г <sup>-1</sup>	Антиоксидантна активність, мг·г <sup>-1</sup>
<i>Rubus idaeus</i>	К*	9,0 ±0,05	2,9 ±0,06	3,04	11,6 ±0,06	1,5 ±0,03
	Фе	7,3 ±0,04	2,0 ±0,04	3,58	6,5 ±0,03	2,4 ±0,05
	Кв	6,4 ±0,03	1,6 ±0,03	4,02	4,9 ±0,02	2,1 ±0,04
	Сн	7,6 ±0,05	3,0 ±0,05	2,50	9,0 ±0,05	2,1 ±0,03
	Су	9,0 ±0,05	2,7 ±0,04	3,39	8,4 ±0,04	2,1 ±0,02
НІР <sub>0,05</sub>		0,39	0,12	0,17	0,40	0,10
<i>Ribes nigrum</i>	К	5,2 ±0,03	2,1 ±0,03	2,42	8,3 ±0,04	1,7 ±0,01
	Вн	4,5 ±0,02	1,4 ±0,02	3,22	5,6 ±0,03	2,3 ±0,04
	Фе	3,5 ±0,03	1,4 ±0,03	2,55	4,6 ±0,02	1,4 ±0,02
	Кв	7,6 ±0,04	1,8 ±0,03	4,15	6,5 ±0,03	1,5 ±0,03
	Сн	3,1 ±0,03	1,7 ±0,02	1,82	4,2 ±0,02	1,3 ±0,01
	Су	4,3 ±0,02	2,3 ±0,04	1,87	9,2 ±0,05	2,2 ±0,05
НІР <sub>0,05</sub>		0,24	0,10	0,13	0,34	0,09
<i>Vitis vinifera</i>	К	17,3 ±0,09	1,1 ±0,02	15,15	5,9 ±0,01	5,1 ±0,05
	Вн	30,7 ±0,15	1,6 ±0,02	19,66	11,3 ±0,06	14,8 ±0,07
	Фе	35,6 ±0,18	2,7 ±0,05	13,30	6,2 ±0,04	8,8 ±0,04
	Кв	35,6 ±0,16	1,5 ±0,03	23,89	13,4 ±0,07	10,1 ±0,05
	Сн	21,8 ±0,10	1,3 ±0,02	17,27	8,0 ±0,05	9,4 ±0,05
	Су	22,7 ±0,11	1,5 ±0,04	14,79	7,4 ±0,03	7,3 ±0,02
НІР <sub>0,05</sub>		1,36	0,08	0,87	0,44	0,48

\* Примітка. К – контроль; оксикоричні кислоти: Вн – ванілінова, Фе – ферулова, Кв – кавава, Сн – сирінгова, Су – сума всіх кислот

У проведених нами дослідженнях, найцікавіший у прикладному значенні ефект було виявлено в культурі *Vitis vinifera* сорту Геркулес. Ферулова і сирінгова кислоти, до їх складу входять відповідно одна і дві метоксигрупи, стимулювали синтез фенольних сполук. Дослідження екстрактів методом високоефективної тонкошарової хроматографії дозволило виявити в зразках високий вміст речовин із коефіцієнтом рухомості  $R_f \sim 0,50$  і  $R_f \sim 0,75$  (рис. 5.2) на сорбенті Silicagel G60 (Merck) у системі розчинників: (v /v/ v/ v – 60/ 32/ 12/ 8) хлороформ – оцтова кислота – метанол – вода.

Під час аналізу екстрактів методом високоефективної рідинної хроматографії було встановлено, що ці речовини мають спектри і час утримання характерний для стильбеноїдів – резвератрола та його глікозида – піцеїда. Резвератрол – надзвичайно активний поліфенольний антиоксидант, що синтезується в листках винограду та деяких інших рослин у відповідь на атаку фітопатогенних грибів і виконує роль фітоалексину. Вважається, що саме резвератрол та його кон'югати є одними з найактивніших природних нутрієнтів, що запобігають розвитку серцево–судинних захворювань.

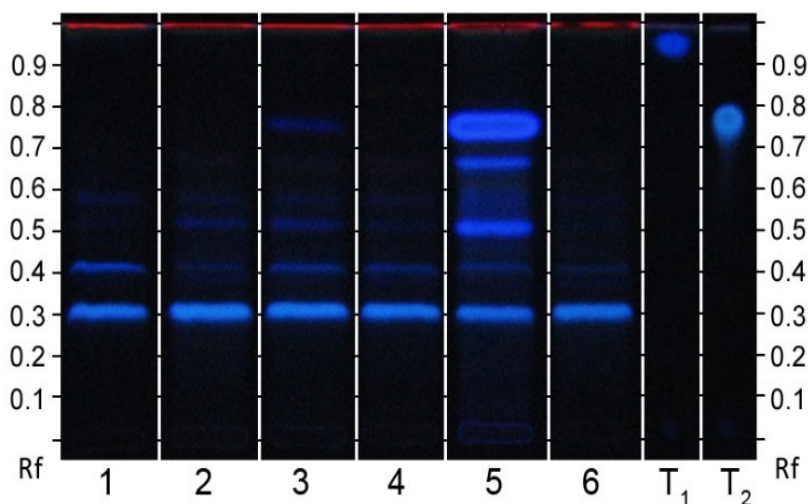


Рисунок 5.2. Хроматограма MeOH екстрактів листків *Vitis vinifera* в культурі *in vitro* на живильному середовищі з додаванням фенольних кислот (конц. –  $10^{-6}M$ ): 1 – контроль; 2 – сума кислот; 3 – сирінгова; 4 – кавова; 5 – ферулова; 6 – ванілінова; стандарти:  $T_1$  – ферулова кислота;  $T_2$  – кавова кислота (візуалізація – ультрафіолету 366 нм)

Резвератрол синтезується в рослинному організмі з *p*-кумарової кислоти. Проте на хроматограмах вона не визначена. Активація синтезу резвератролу та інших стильбеноїдів відбувається внаслідок трансдукції хімічного сигналу під час транслокації молекул ферулової кислоти в наднизьких концентраціях ксилемою. Далі ця фенольна сполука від термінальних трахеїд розгалуженої сітки жилок потрапляє в міжклітинники мезофілу. Ферулова кислота входить до складу клітинних стінок рослин. Через ефірний зв'язок вона створює диферулові мости, які зв'язують між собою фібрили целюлози. Вихід у міжклітинний простір кон'югатів або диферулових



сполук може бути пов'язаний із початком деструкції целюлози та геміцелюлози, що в реальних умовах часто відбувається під впливом глюконаз або геміцелюлаз грибів.

Отже, цілком ймовірно, що в матриксі клітинних стінок мезофілу *Vitis vinifera* наявні відповідні сенсорні білки. Їх функція може полягати в реалізації системи екстрацелюлярного сигналіngu під час проникнення целюлозоруйнівних грибів у тканини рослини [9]. Реалізація запуску відповідних імунних реакцій, однією зі складових якої є синтез резвератролу, виглядає досить очевидною.

Для перевірки цієї гіпотези було проведено серію експериментів, у яких асептичні листки рослин-регенерантів протягом 1 год обробляли 1мМ розчином ферулової кислоти. Як показали отримані результати, хімічно чисті розчини ферулової кислоти не стимулюють синтез резвератролу. Проникнення кислоти через зовнішні тканинні бар'єри кутикули листків значно ускладнюють розвиток відповідних реакцій, окрім того, рухаючись транспортною системою стебла і листків, ферулова кислота може піддаватись біохімічній трансформації й етирифікації. Для з'ясування цього процесу проведено спеціальні дослідження. Показано: якщо зрізані листки *Vitis vinifera* витримувати протягом 24 год у чашках Петрі зі суспензією ферментованих і неферментованих решток клітинних стінок винограду, у них утворюється резвератрол та його кон'югати (рис. 5.3).

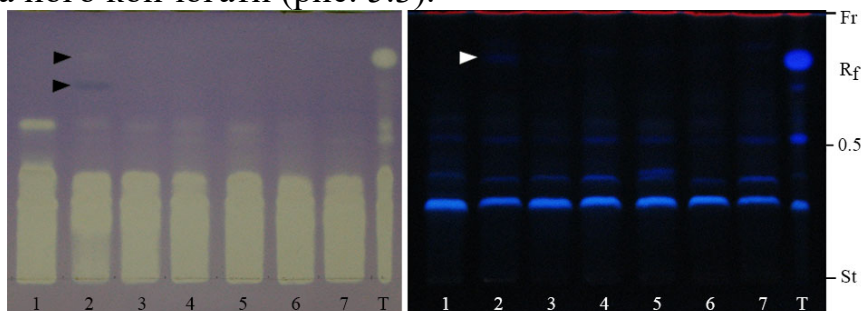


Рисунок 5.3. Хроматограма розділення вторинних метаболітів з листків *Vitis vinifera*; речовини з  $R_f \sim 0,52$  і  $R_f \sim 0,82$  ідентифіковані як піцеїд та резвератрол відповідно; 1 – контрольні листки; 2, 3, 4 – листки, що обробляли неферментованими рештками клітинних стінок; 5,6,7 – листки, що обробляли ферментованими рештками листків; Т – стандарт транс-резвератрола і транс-піцеїда; а – антиоксидантна активність індивідуальних сполук (реакція на ДФПГ), б – візуалізація продуктів в ультрафіолетових променях (366 нм); стрілкою показана сполука з коефіцієнтом рухомості  $R_f \sim 0,82$  відповідним резвератролу

Проведений експеримент довів, що рештки клітинних стінок містять речовини, які здатні викликати в ізольованих асептичних листках активацію синтезу резвератрола. Крім того, було встановлено, що рештки клітин індукують у листках синтез антоціану (рис. 5.3, показано стрілкою  $R_f \sim 0,73$ ). Цей факт свідчить про розвиток відповідних захисних реакцій у мезофілі листків, індукованих компонентами клітинних стінок.

У рослин регенерантів троянди ефіроолійної (сорт Лань) на модифікованому живильному середовищі Куаріна–Леповре додавання оксикоричних і оксибензойних кислот при концентрації 1 мМ/л викликало утворення калюсних тканин у термінальній зоні базальної частини пагонів [6]. Збільшення кількості оксигруп у структурі ароматичного ядра посилювало калюсогенність живильного середовища. Також було показано, що електронодонорні замісники першого роду (метильні і гідроксигрупи) посилюють калюсогенез. Цей ефект відбувається внаслідок активної проліферації клітин на фоні уповільнення їхньої диференціації. Калюсні тканини складаються переважно з тонкостінних паренхімних клітин із високим коефіцієнтом співвідношення об'єму цитоплазми до ядра. Уповільнення формування вторинних клітинних стінок зазвичай обумовлені гормональними стимулами і тому мало залежали від накопичення фенольних сполук. Так, під впливом ванілінової і сирінгової кислот, що мають у складі одну і дві метоксигрупи відповідно, у рослин–регенерантів посилювався синтез фенолів. Сирінгова кислота є інгібітором альфа–глюкозидази – ферменту класу гідролаз, яка пов'язана з процесами деглюкозилювання багатьох органічних сполук, оліго– і полісахаридів, мальтози і сахарози.

Отже, підвищена кількість сирінгової кислоти здатна суттєво впливати на процеси енергозабезпечення клітин [8]. Водночас підвищення кількості фенолів у тканинах свідчить про зміщення метаболічного балансу до синтезу фенілаланіну з подальшим утворенням фенольних сполук шикиматним шляхом.

## **5.2. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на морфогенез і фенольний синтез деревних рослин *in vitro***

Збільшення кількості гідроксигруп у структурі ароматичного кільця (галова кислота) навпаки призводила до уповільнення фенольного синтезу, зокрема катехінів, що особливо важливо для культури *in vitro*, оскільки окиснення катехінів супроводжується їхньою поліконденсацією через яку відбувається блокування судин, аутоінтоксикація рослинних тканин й уповільнення транспорту важливих для рослини компонентів живильного середовища.

Галова кислота в складі живильного середовища Мурасиге-Скуга викликала пробудження сплячих бруньок і стимулювала ріст пагонів *Salix alba* L. в культурі *in vitro*. У концентрації 1 мМ/л вона сприяла галуженню стебел, розвитку і росту бічних коренів (рис. 5.4). Утім варто зазначити, що чутливість різних рослин до галової кислоти відрізнялась. Навіть серед регенерантів виділялись рослини з ознаками пригніченого росту, і такі, які виявляли ростові показники, що в 1,3–1,5 раза перевищували рослини на контролі. Цей факт свідчить про надзвичайно високу активність галової кислоти і її здатність впливати на ростові процеси.

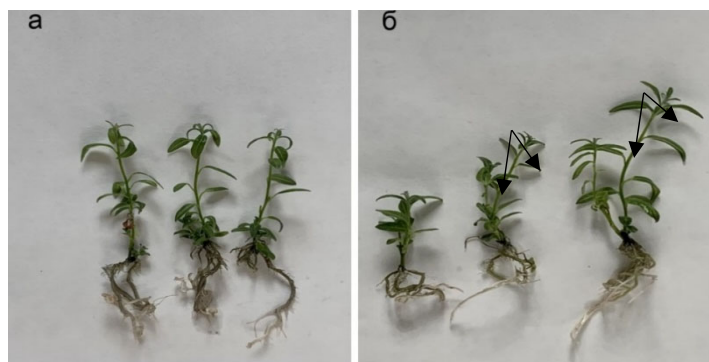


Рисунок 5.4. Рослини–регенеранти *Salix alba in vitro*: а – контроль, б – галова кислота (1 мМ/л); лінійка – 10 мм

Оскільки галова кислота має високий антиоксидантний потенціал і входить до складу гідролізованих танінів, її роль в регуляції фізіологічних процесів багатовекторна. У експерименті галова кислота сприяла зниженню ефекту апікального домінування, що пов'язано з вертикальним градієнтом концентрації ауксинів. Формування бічних коренів і бічних пагонів вказують на суттєві зміни в транспорті й розподілі фітогормону в тканинах, водночас різні ростові показники свідчать про індивідуальну чутливість рослин до негормональних стимулів, які можуть бути цікаві з огляду на виявлення особливо чутливих генотипів.

Подібний процес спостерігався і в експерименті з різними сортами *Corylus avellana* L. На початкових стадіях культивування галова кислота стимулювала пробудження бічних бруньок і активний ріст рослин–регенерантів порівняно з контролем. Поступово швидкість росту рослин уповільнювалась і різниця між ними та контрольною групою рослин зменшувалась (рис. 5.5).

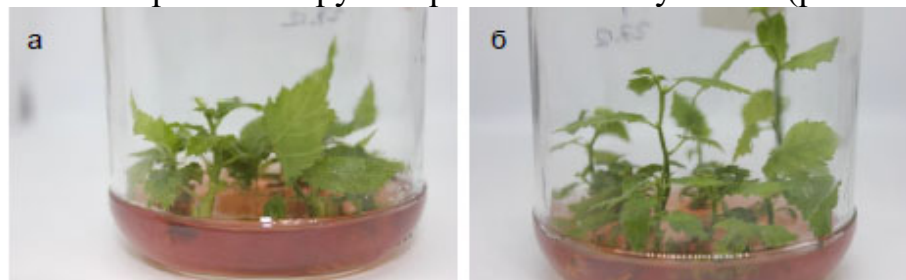


Рисунок 5.5. Рослини–регенеранти *Corylus avellana in vitro*: а) контроль, б) на модифікованому ЖС з галовою кислотою (1 мМ/л)

Загальна площа листків і ширина листкової пластинки відносно її довжини зменшувались на середовищі з галовою кислотою, що свідчить про уповільнення проліферації клітин маргінальної меристеми.

За впливом галової кислоти на показники загального вмісту фенольних сполук досліджувані сорти поділили на дві групи. В одній – галова кислота порівняно з контролем гальмувала синтез фенолів (сорти Тонда Романа, Тонда Гентіль Деле Ланге, Барселона), сорти другої групи (Тонда Ді Джифоні, Мортарелла, Епсилон) на присутність галової кислоти, навпаки, підвищували

синтез фенольних сполук. Цікаво те, що розподіл за цими групами збігається із комплементарністю сортів для запилення. Так, італійській ранньостиглий сорт Тонда Гентіль Деле Ланге запилюється сортом більшого калібру – Тонда Романа, а ранній, доволі морозостійкий, італійський сорт Тонда ді Джиффоні є основним для плодоношення, а інший італійський сорт – Мортарелла – рекомендовано використовувати як запилювач.

Сорт селекції Орегонського університету (США) Барселона є раннім і також відноситься до морозостійких. Інший сорт тієї ж селекції – Епсилон рекомендовано як запилювач. Варто зазначити, що сорти рекомендовані для плодоношення мають вищий вміст фенольних сполук (Тонда Гентіль Деле Ланге і Тонда Ді Джиффоні), порівняно з сортами для запилювання (Мортарелла) (табл. 5.3).

У цілому італійські сорти, порівняно з сортами селекційного центру Орегонського університету, характеризуються більшим вмістом у листках фенольних сполук. Галова кислота достовірно підвищувала вміст флавоноїдів у листках лише італійських сортів Тонда Ді Джиффоні і Мортарелла, які зазвичай рекомендують як комплементарну пару. У решти сортів і в дикій формі галова кислота зменшувала вміст флавоноїдів.

Таблиця 5.3

Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на вміст і співвідношення фенольних сполук у листках рослин *Corylus avellana in vitro* ( $x \pm SE$ ;  $n = 4$ )

Вид/сорт	ЖС	ФН	ФЛ	ФН/ФЛ
Дика форма	Контроль	36,5 $\pm$ 2,19	8,6 $\pm$ 0,69	4,3
	ГК	32,1 $\pm$ 1,93	4,5 $\pm$ 0,36*	7,1
Тонда Романа	Контроль	40,8 $\pm$ 3,45	6,9 $\pm$ 0,55	5,9
	ГК	37,2 $\pm$ 2,23	4,9 $\pm$ 0,39*	7,6
Тонда Гентіль Деле Ланге	Контроль	62,8 $\pm$ 3,77	6,4 $\pm$ 0,51	9,8
	ГК	45,8 $\pm$ 4,15*	4,5 $\pm$ 1,36*	10,2
Барселона	Контроль	36,1 $\pm$ 2,17	6,5 $\pm$ 0,52	5,5
	ГК	26,4 $\pm$ 1,59*	4,1 $\pm$ 0,33*	6,4
Тонда Ді Джиффоні	Контроль	40,0 $\pm$ 2,80	6,0 $\pm$ 0,78	6,6
	ГК	44,8 $\pm$ 3,19	8,0 $\pm$ 1,64*	5,6
Мортарелла	Контроль	26,2 $\pm$ 1,57	5,1 $\pm$ 0,40	5,2
	ГК	43,4 $\pm$ 2,61*	5,6 $\pm$ 0,45	7,8
Епсилон	Контроль	26,6 $\pm$ 1,60	5,4 $\pm$ 0,43	5,0
	ГК	47,0 $\pm$ 2,82*	5,2 $\pm$ 0,42	9,0

Примітка ГК – галова кислота, \* – різниця з контролем достовірна за  $p < 0,05$

Отже, галова кислота в концентрації, яка співвідноситься з кількістю фітогормонів (1 мМ/л), здатна впливати на морфогенез і фенольний синтез рослин, стимулювати проліферацію клітин, прискорювати або гальмувати фенілпропаноїдний синтез. Утім її дія не є специфічною і залежить від умов середовища і особливостей генотипу рослини.

Виявлено, що оксикоричні і оксибензойні кислоти за концентрації в 1 мМ/л активно впливають на фенілпропаноїдний синтез рослин, які вирощуються *in vitro* та виконують функції неспецифічних регуляторів росту.

З'ясовано, що в листках винограду культурного *Vitis vinifera* ферулова кислота стимулює синтез стильбеноїдів, які володіють властивістю фітоалексинів і сприяють захисту рослинного організму від фітопатогенів.

Вивчено механізм, за яким під час ферментативного гідролізу клітинних стінок листків винограду відбувається вивільнення ферулової кислоти, через що запускаються процеси, які призводять до підвищення в рослинних тканинах вмісту резвератрола та інших видів стильбеноїдів.

Встановлено, що фізіологічна активність оксикоричних і оксибензойних кислот залежить від положення та кількості замісників у структурі ароматичного кільця. Замісники електрондонорні першого роду (гідроксигрупи і метильні) посилюють калюсогенез у рослин, які вирощуються *in vitro*. Кислоти сирінгова та ферулова, до складу яких входять відповідно 1 і 2 метоксигрупи, сприяють синтезу фенольних сполук, а зростання кількості гідроксигруп в ароматичному кільці (галова кислота), навпаки, - вповільнюють синтез фенольних сполук, що актуально для культури *in vitro*. Реакції рослин різних видів на фенолкарбонові кислоти є специфічними, а їх прояв та інтенсивність можуть суттєво вирізнятись. Наявність індивідуальних фенолкарбонових кислот у тканинах рослин навіть у мікромольних концентраціях може істотно впливати на їхню функціональність.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 5

1. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В. В. Докучаєва. Серія: Біологія. 2007. Вип. 3. С. 6–26.
2. Ліханов А. Ф. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на синтез пластидних пігментів і фенольних сполук у листках винограду (*Vitis vinifera*) *in vi tro*. / Ліханов А. Ф., Серета О. В., Кляченко О. Л., Мельничук М. Д. Физиология растений и генетика. 2018. Т. 50. № 4. С. 331–343.
3. Макаренко О. А. Фізіологічні функції флавоноїдів в рослинах. / Макаренко О. А., Левицький А. П. Фізіологія і біохімія культурних рослин. 2013. Т. 45, № 2. С. 100–112.
4. Макарова Л.Е. Физиологическое значение фенольных соединений при формировании бобово-ризобияльного симбиоза на этапе преинфекции. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія, 2012. №2. С. 25–40.;
5. Машковська С. П. Фенолкарбонові кислоти видів роду Чорнобривці (*Tagetes* L.). / Машковська С. П., Головка Е. А., Григорюк І. П. Доповіді НАН України. 2008. №5. С. 158–161.;
6. Олійник О.О. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на метаболізм та регенераційні процеси в експлантатах троянди ефіроолійної у культурі *in vitro*. Біологічні системи. / Олійник О.О., Ліханов А.Ф., Мельничук М. Д. 2017. Т.9. Вип. 1. С. 33–38.
7. Федорова Г. В. Практикум з біогеохімії для екологів: навч. посіб. Киев: КНТ, 2007. С. 153–162.
8. Ikeda R., Uyama H., Kobayashi S. Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide). Laccase–Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid. *Macromolecules*, 1996. Vol. 29(8). P. 3053–3054.
9. Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. Vol. 50(10), P. 2731–2741.
10. Jorgen H., Jorgensen L., Newman M., Christensen L., Mazur S. P., Nes A., Wold A. B., Remberg S. F., Aaby K. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *J. Food Chem.* 2014. Vol. 160. P. 233–240.



## Розділ 6

### ФЕНОЛЬНІ ІНГІБІТОРИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ ДЕРЕВИНИ

Синтез у рослинних тканинах фенольних сполук певного класу є показником стресу, або патогених процесів [7, 12]. Синтез фенолів пов'язаний із підвищеною активністю фенолаланін аміак-ліази (PAL), халконсінтази (CHS), також інших ферментів вторинного синтезу [1]. Рослинні феноли виконують найрізноманітніші функції і допомагають рослинному організму адаптуватися до несприятливих чинників навколишнього середовища [4, 5]. Вони беруть участь у регуляції процесів транскрипції, впливають на проникність мембран, трафік везикул і трансдукцію хімічних сигналів. Індукторами синтезу флавоноїдів можуть бути цукри. Зокрема, на активність халконсінтази (CHS), яка є ключовим ферментом у синтезі флавоноїдів, впливає концентрація сахарози [10]. Це пояснює деяке збільшення вмісту флавоноїдів у листках у нічний час доби. Водночас, відповідними сигнальними молекулами можуть бути олігосахариди, які утворюються в процесі ферментативного гідролізу целюлозолігнінових комплексів екзоферментами грибів.

За нашими даними, збільшення в листках дуба звичайного з ознаками побуріння деревини частки глікозидів кемпферола може бути обумовлено змінами в регуляції відповідних ферментних систем. Такі процеси можуть бути пов'язані з надходженням у листки через ксилему специфічних продуктів біохімічної трансформації деревини.

Відомо, що попередником кемпферола є дігідрокемпферол, який синтезується з нарингеніна за допомогою флавоон 3-гідроксилази (F3H). Синтез дигідрокверцетина можливий з дигідрокемпферола або еріодіктіолу. Обидва ці продукти утворюються з нарингеніну [11]. У синтезі еріодіктіолу бере участь фермент флавоон 3'-гідроксилаза (F3'H), яка також синтезує дигідрокверцетин з дигідрокемпферола. Отже, обидва шляхи синтезу кверцетину можливі за участю F3'H [2]. Зниження активності цього ферменту може приводити до збільшення частки кемпферола і його глікозидів у рослинних тканинах. Кверцетин і кемпферол відомі як найважливіші регулятори транспорту ауксину [6]. Флавоноли активно впливають на дію ІОК оксидаз, які інактивують ауксини. Водночас, кемпферол, що містить одну гідроксильну групу в В-кільці, активує цей фермент, а кверцетин з двома гідроксильними групами є його інгібітором.

У синтезі флавонолів зміщення балансу в бік кемпферола може призводити до деякого зниження активних форм ауксину і відповідно – до ослаблення росту клітин розтягненням. Цей процес у разі збільшення активності аніонних пероксидаз може мати пристосувальне значення. Оскільки клітини в ділянках побуріння деревини мають менший діаметр і потовщені лігніфіковані клітинні стінки, вони стійкіші до деструктивних процесів, що викликають патогенні мікроорганізми і гриби. Окрім того, відомо також, що нарингенін і кемпферол володіють антифунгальною

активністю, наприклад до *Pyricularia oryzae*. Хлорогенова кислота і рутин пригнічують розвиток *Fusarium oxysporum*, а катехол і протокатехова кислота – *Colletotrichum circinans*.

Збільшення загального змісту фенолів у тканинах рослин *Quercus robur* з ознаками побуріння відбувалося переважно через накопичення гідролізованих танінів. Антифунгальні властивості танінів і проантоціанидинів добре відомі. Вони пригнічують *Aspergillus niger*, *Colletotrichum graminicola*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trichoderma* та ін. Дубильні речовини захищають деревину від розкладання грибами і пригнічують активність позаклітинних гідролаз фітопатогенних мікроорганізмів [8, 9]. Отже, фенольні сполуки здатні знижувати ефективність ферментативного гідролізу деревини та збільшувати витрати на отримання кінцевого продукту в біосинтезі етанолу.

Розчинні феноли зазвичай утворюються за умов переважної більшості способів попередньої обробки деревини: кислотної або лужної обробки, незалежно від походження рослинного матеріалу трав'яних рослин, хвойних чи листяних порід [3]. За даними Qin зі співавторами, ванілін як один із типових фенольних похідних лігніну, під час ферментативного гідролізу за концентрації 10 мг/мл здатний удвічі пригнічувати активність целюлази.

У наших дослідженнях було показано, що в розчинній формі до і під час ферментативного гідролізу склад фенольних компонентів дещо змінюється (рис. 6.1.). Так, виявлено значну кількість водорозчинної фенольної сполуки з яскраво блакитною флуоресценцією в УФ ( $\lambda=366$  нм) у зразках із деревиною липи ( $R_f \sim 0,87$ ). Після ферментації фенольна речовина не виявлялась, але на хроматограмі показано наявні інші сполуки у мінорних кількостях. Можна припустити, що речовина з  $R_f \sim 0,87$  є потенційним інгібітором целюлаз.

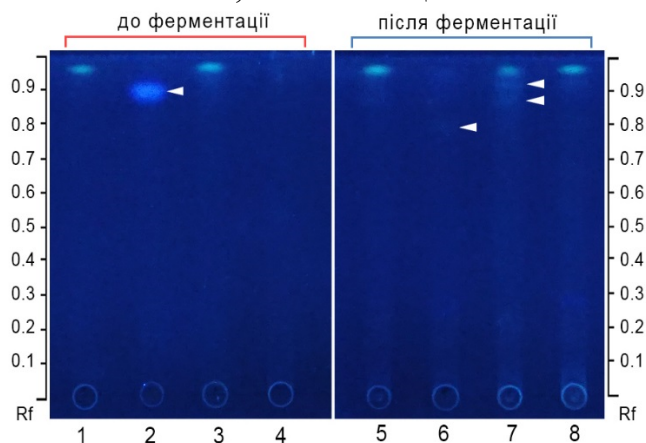


Рисунок 6.1. Хроматограма фенольних сполук у деревині *Betula pendula* (1, 5), липи (2, 6), *Prunus avium* (3, 7), *Populus nigra* (4, 8) (система: толулол, етилацетат, етилметил кетон, мурашина кислота, вода – 2:50:30:5:5 (v/v/v/v/v)); стрілками показано продукти, що наявні в розчинах до (2) та після (6, 7) ферментативного гідролізу

Під час гідролізу в субстратній суміші з деревиною *Prunus avium* також вивільняються додаткові малополярні продукти вторинного синтезу ( $R_f \sim 0,88$ ;

Rf~0,91). Такий ефект може бути пов'язаний з окиснюванням основного розчинного фенольного продукту, або вивільненням окремих речовин у ході біодеградації деревини. Варто зазначити, що в процесі ферментації деревини *Betula pendula*, *Prunus avium* L. і *Populus nigra* L виявлено загальну тенденцію до збільшення водорозчинної фракції фенольних сполук у субстратних сумішах (рис. 6.2, а, в, г).

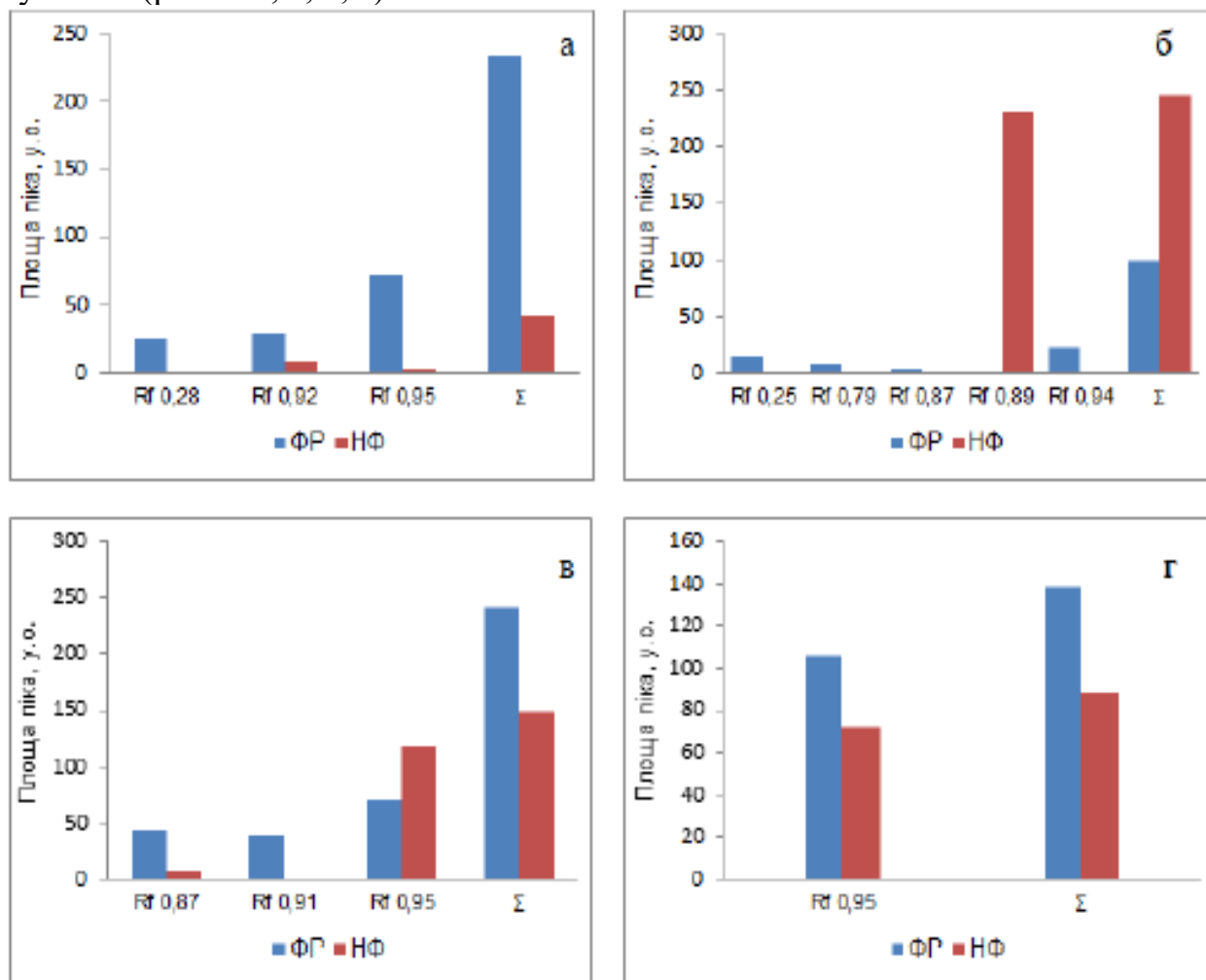


Рисунок 6.2. Вплив ферментативного гідролізу деревини на вивільнення фенольних сполук: у деревині *Betula pendula* (а), *Tilia cordata* Mill (б), *Prunus avium* L. (в), *Populus nigra* L. (г); ФР – ферментований субстрат, НФ – неферментований субстрат

Зменшення загальної кількості й окремих індивідуальних фенольних продуктів під час ферментації зменшувалась лише у варіанті, де в ролі субстрату для целюлази використовувалась деревина *Tilia cordata* (рис. 6.2, б).

Отже, у разі проведення подібних досліджень доцільно з'ясувати інгібувальну здатність речовин-кандидатів стосовно целюлаз, визначити їхню хімічну природу та підібрати ефективні способи для нейтралізації їхньої дії на ферментні системи.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 6

1. Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013. Vol. 72. P. 1–20.
2. Deng Y., Lu S. Biosynthesis and Regulation of *Phenylpropanoids* in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2017. Vol. 36, №. 4. P. 257–290.
3. Kim Y. , Kreke T ., Hendrickson R, Parenti J. , Ladisch M. R. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresource Technology* 135. 2013. P. 30-38.
4. Lattanzio V., Cardinali A., Ruta C., Morone Fortunato I., Lattanzio V.M.T, Linsalata V., Cicco N. Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare L.*) shoot cultures under nutritional stress. *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 65. P. 54–62.
5. Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. In *Handbook of Natural Products*. Ed. K. G. Ramawat, J. M Merillon. Germany, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. P. 1543–1580.
6. Murphy A., Peer W. A., Taiz, L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 2000. Vol. 211(3). P. 315.
7. Naikoo M.I., Dar M.I., Raghieb F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Naushin F. Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance. *Plant Signaling Molecules*. 2019. P. 157–168.
8. Nghi D. H., Bittner B., Kellner H., Jehmlich N., Ullrich R., Pecyna M. J., Nousiainen P., Sipilä J., Huong L. M., Hofrichter M., Liersa C. The Wood Rot Ascomycete *Xylaria polymorpha* Produces a Novel GH78 Glycoside Hydrolase That Exhibits  $\alpha$ -L-Rhamnosidase and Feruloyl Esterase Activities and Releases Hydroxycinnamic Acids from Lignocelluloses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78. №14. P. 4893–4901.
9. Nghi D. H., Ullrich, R., Moritz, F., Huong, L. M., Giap, V. D., Chi, D. H., Liers C. The ascomycete *Xylaria polymorpha* produces an acetyl esterase that solubilises beech wood material to release water-soluble lignin fragments. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2015. Vol. 58(3). P. 415–421.
10. Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P. Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2006. Vol. 140 (2). P. 637–646.
11. Tan J., Tu L., Deng F., Hu H., Nie Y., Zhang X. A genetic and metabolic analysis revealed that cotton fiber cell development was retarded by flavonoid naringenin. *Plant Physiology*. 2013. V. 162 (1). P. 86–95.
12. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. Vol. 5. P. 218–223.

## Розділ 7

### ЗАЛЕЖНІСТЬ РОЗПОДІЛУ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ТКАНИНАХ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Вірусні хвороби хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) суттєво знижують у рослинному організмі синтез  $\alpha$ - та  $\beta$ -кислот, ароматичних і гірких речовин, які є основними комерційними компонентами культури [3]. Достовірно відомо 20 вірусів, що уражують рослини хмелю звичайного. Найшкідливішими для хмелярства є віруси скручування листків хмелю (ВСЛХ), вірус жовтої мозаїки хмелю (ВЖМХ), латентний вірус хмелю (ЛВХ) і американський латентний вірус (АЛВХ), вірус огіркової мозаїки (ВОМ) та вірус мозаїки яблуні (ВМЯ) [5]. У разі системного ураження рослин вірусом скручування листків хмелю ВСЛХ вміст  $\alpha$ - та  $\beta$ -кислот у супліддях хмелю зменшується майже у чотири рази. За умов вертикального переносу перші вірусні частки в не інокульованих листках спочатку виявляються в трахеїдах дрібних повідних пучків. Транслокація вірусів у тканинах листка відбувається переважно від трахеїд дрібних пучків через клітини обкладинки в стовпчасту паренхіму, клітини якої на перших стадіях патогенезу уражуються активно [3]. В елементах флоєми вірусні частки виявляються на стадії значних хлоротичних змін і пошкоджень тканин листка [7]. Деструктивні процеси в тканинах вегетативних і генеративних органів рослин супроводжуються значним збільшенням синтезу вторинних метаболітів у протопластах і клітинних стінках [6, 10]. Одним із механізмів захисту рослини від патогенів є синтез похідних фенілпропаноїдів, до групи яких відносять речовини, здатні порушувати цілісність цитоплазматичних мембран фітопатогенів. Бар'єрні властивості клітинам забезпечують зв'язані з клітинними стінками кислі пероксидази, які залучені до синтезу компонентів лігніну та суберину. Особлива роль у формуванні конституціональної стійкості рослин належить оксидазам, гідролітичним ферментам хітиназам і  $\beta$ -1,3-глюканазам. Відповідною реакцією рослини на вірусну інфекцію є синтез саліцилової кислоти (СК) – ендогенної сполуки фенольної природи. Саліцилова кислота здатна пригнічувати процес реплікації і транслокації вірусів у тканинах рослин. У кон'югованій формі вона утворює метилсаліцилат, який підвищує експресію генів PR-1 білків (pathogenesis-related) і сприяє розвитку реакції системної стійкості рослин до вірусів [7]. Місцем синтезу і накопичення саліцилова кислота є хлоропласти, звідки вона легко транспортується по флоємі. У гептані та підкисленому етанолі саліцилова кислота має сильну флуоресценцію з максимумом емісії 480 нм, а в етилатінатрію – 420 нм, що дозволяє виявляти цю фенольну сполуку в тканинах рослини [4]. Візуально найпомітнішим симптомом вірусного ушкодження рослин *Humulus lupulus* є прояви різних типів хлорозу. Депігментація листків пов'язана зі структурними порушеннями хлоропластів і руйнуванням молекул хлорофілу. Рисунок і динаміка прояву хлоротичних змін має певний зв'язок із особливостями васкулярного транспорту вірусів у тканинах листків. Пасивна транслокація

вірусних частинок відбувається по ксилемі до кінцевих трахеїд, звідки вони з висхідним потоком потрапляють у апопласт і далі з потоком води рухаються переважно до клітин палисадної паренхіми. Особливості транспорту вірусів у тканинах листка пояснює характер розвитку міжжилкового вірусного хлорозу. Хлоротичні зміни спочатку проявляються між жилками другого і третього порядків (рис. 7.1, а).

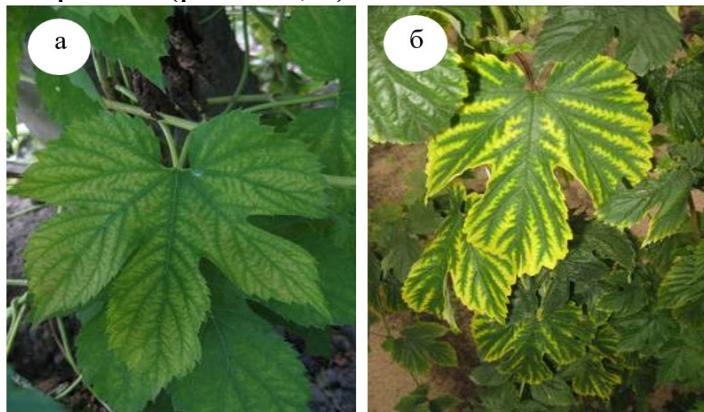


Рисунок 7.1. Листки *Humulus lupulus*: початкова (а) та завершальна (б) стадії вірусного хлорозу

У випадках прогресувальної вірусної хвороби хлороз листків хмелю набуває значної контрастності до повного порушення характерної пігментації (рис. 7.1, б). Для ідентифікації вірусів і підтвердження вірусної етіології хлоротичних змін у листках хмелю нами було проведено мультиплексну ЗТ–ПЛР. У результаті було отримано амплікони розміром – 427 п.н., 157 п.н., 109 п.н., які знаходяться в оптимальному діапазоні, що відповідає ділянкам генів *Hop latent virus* (HLV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Apple mosaic virus* (ApMV) відповідно. Нами була підтверджена присутність вірусної РНК у досліджуваних зразках (рис. 7.2, проба 3–4).

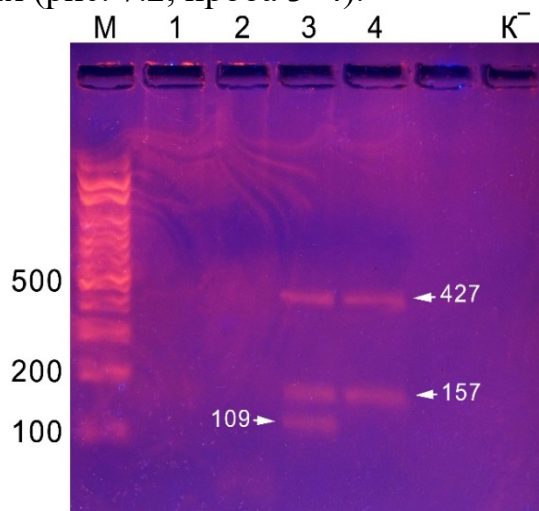


Рисунок 7.2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації ЗТ–ПЛР з листків *Humulus lupulus*: М – маркер молекулярних мас GeneRule™



100 bp DNA Ladder; 1, 2, 4 – сорт Національний; 3 – сорт Заграва; К – негативний контроль

Мікроскопічний аналіз листків хмелю звичайного показав, що в стовпчастій та губчастій паренхімах також нагромаджуються речовини фенольної природи, які здатні до автофлуоресценції. За інтенсивністю флуоресценції було показано, що кількість фенолів у мезофілі листків набагато більша, аніж у центральних та бічних жилках другого і третього порядків (рис. 7.3, а–б).

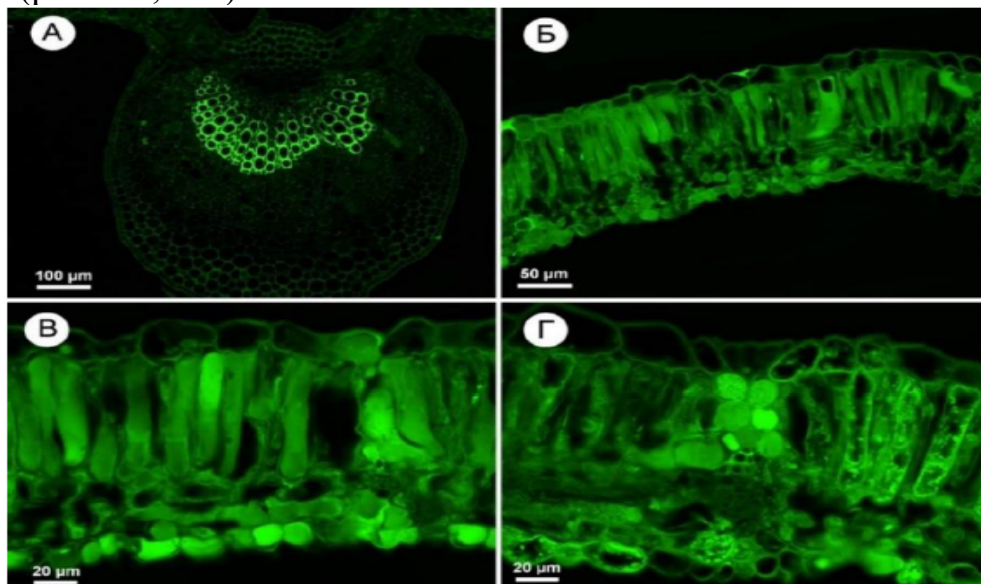


Рисунок 7.3. Накопичення вторинних метаболітів у листках *Humulus lupulus* (поперечний зріз): А – флуоресценція відкладень лігніну в ксилемі центральної жилки; Б – листкова пластинка; В – флуоресценція вторинних метаболітів в клітинах мезофілу та нижнього епідермісу; Г – флуоресценція клітин обкладинки провідного пучка і мезофілу (фарбування флуоресцеїном 1: 1000)

Рослини *Humulus lupulus* характеризуються активним синтезом вторинних метаболітів [9]. Значна їхня кількість за центром синтезу і просторовою локалізацією пов'язана з хлоропластами. За оптимальних умов у хлоропластах мезофілу здорових листків відбувається активний синтез лейкоантоціанідинів і флавонол–глікозидів. Частина з них транспортується в дрібних провідних пучках, і далі - через центральну жилку – в інші органи рослини.

Значна кількість фенольних сполук, що синтезується в листках за шикиматним і ацетатно–малонатним шляхом, мають здатність до автофлуоресценції, що дозволяє визначати центри синтезу і накопичення речовин, спостерігати їх рух тканинами рослини, а також досліджувати деякі процеси біохімічної трансформації продуктів метаболізму в процесі пластичного обміну. До таких речовин відносяться лейкоантоціанідини, флавоноїди, флавонол–глікозиди, фенолкарбонові кислоти (оксибензойна, саліцилова, транскорична), які накопичуються в листках *Humulus lupulus* [2].

Результати флуоресцентної мікроскопії свіжозрізаних листків *Humulus lupulus* показали, що у синьому спектрі (420–460 нм) найбільший квантовий вихід спостерігався в клітинах верхнього і нижнього епідермісів (рис. 7.4. а–б), а також у цистолітах та ідіобластах.

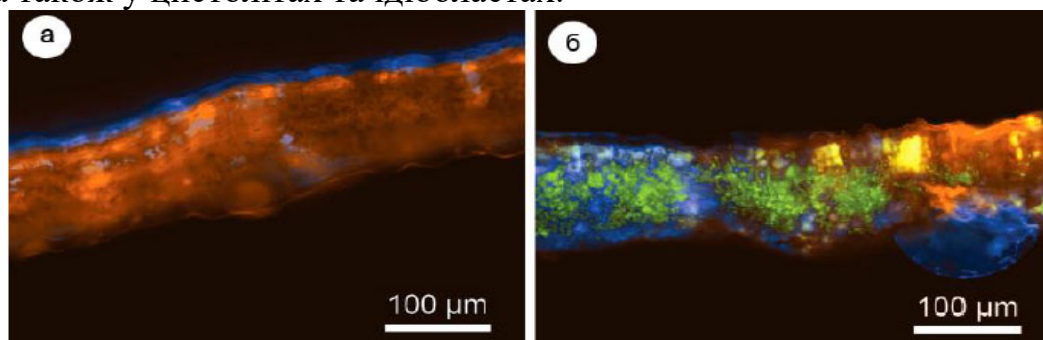


Рисунок 7.4. Автофлуоресценція листків *Humulus lupulus*: неуражений (а) і уражений (б) вірусом

Максимальне поглинання ультрафіолетового світла (340–390 нм) було виявлено нами в клітинах стовпчастої і губчастої паренхіми. Такий спектр поглинання відповідає максимуму (380 нм), який характерний для флавонол-глікозидів. Установлений факт підтверджує дані щодо більшого вмісту цих метаболітів у мезофілі листків порівняно зі стеблом і коренем [1, 2].

У рослин, що уражені вірусами, найінтенсивнішою визначена флуоресценція листків у блакитному (460–500 нм) і жовто-зеленому (546–575 нм) спектрах (рис. 7.4).

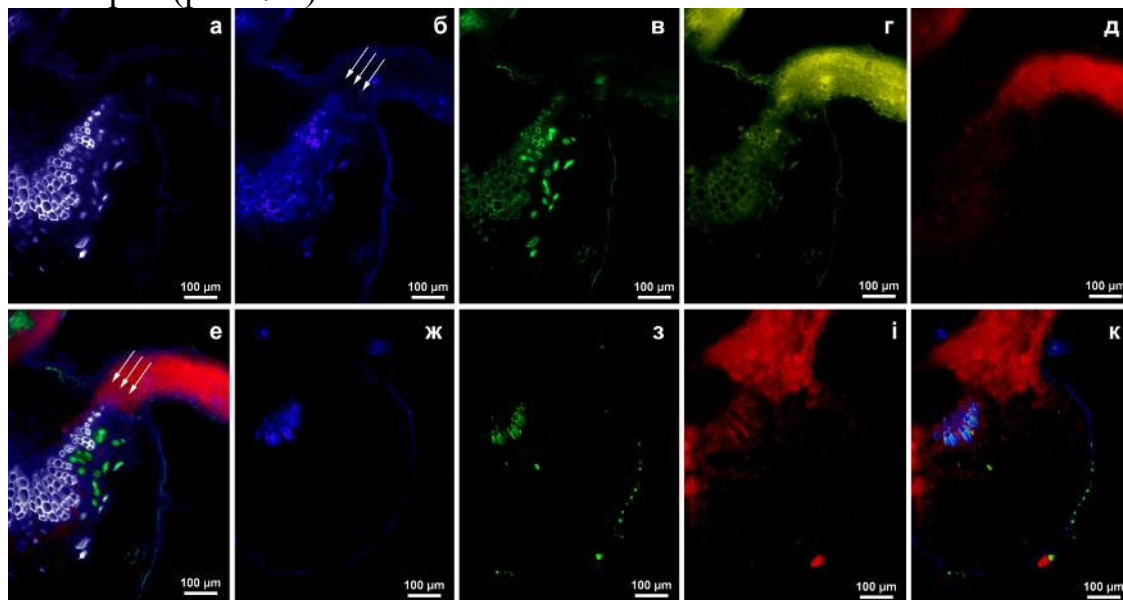


Рисунок 7.4. Автофлуоресценція речовин жилки II-порядку і тканин листкової пластинки з симптомами вірусного хлорозу (а–е) і безсимптомного (г–к) листка *Humulus lupulus*: а, ж – світлова емісія у спектрі – 420–470 нм; б – 460–500 нм; в, з – 505–555 нм; г – 546–575 нм; д, і – 640–690 нм; е, к – комбіноване зображення тканин у оптичних фільтрах 430 нм і 680 нм;

(стрілками показано напрямок зменшення градієнту концентрації біогенних оптично активних сполук)

В епідермісі безсимптомних листків хмелю загальний вміст речовин, які за спектром емісії відповідають фенолам, у 2–3 рази більший, аніж у хлоротичних листків (рис. 7.5, а–в). Проте синтез речовин фенольної природи та саліцилової кислоти на початкових стадіях хлорозу в 6–8 разів збільшується в тканинах стовпчастої і губчастої паренхіми (рис. 7.5, б). Інфекційний процес часто супроводжується збільшенням вмісту в клітинах мезофілу терпенів і флавоноїдів, які здатні до флуоресценції [4, 8] з найбільшим квантовим виходом у зеленому спектрі (505–555 нм). Їхня концентрація в цитоплазмі клітин мезофілу швидко росте (рис. 7.5, в).

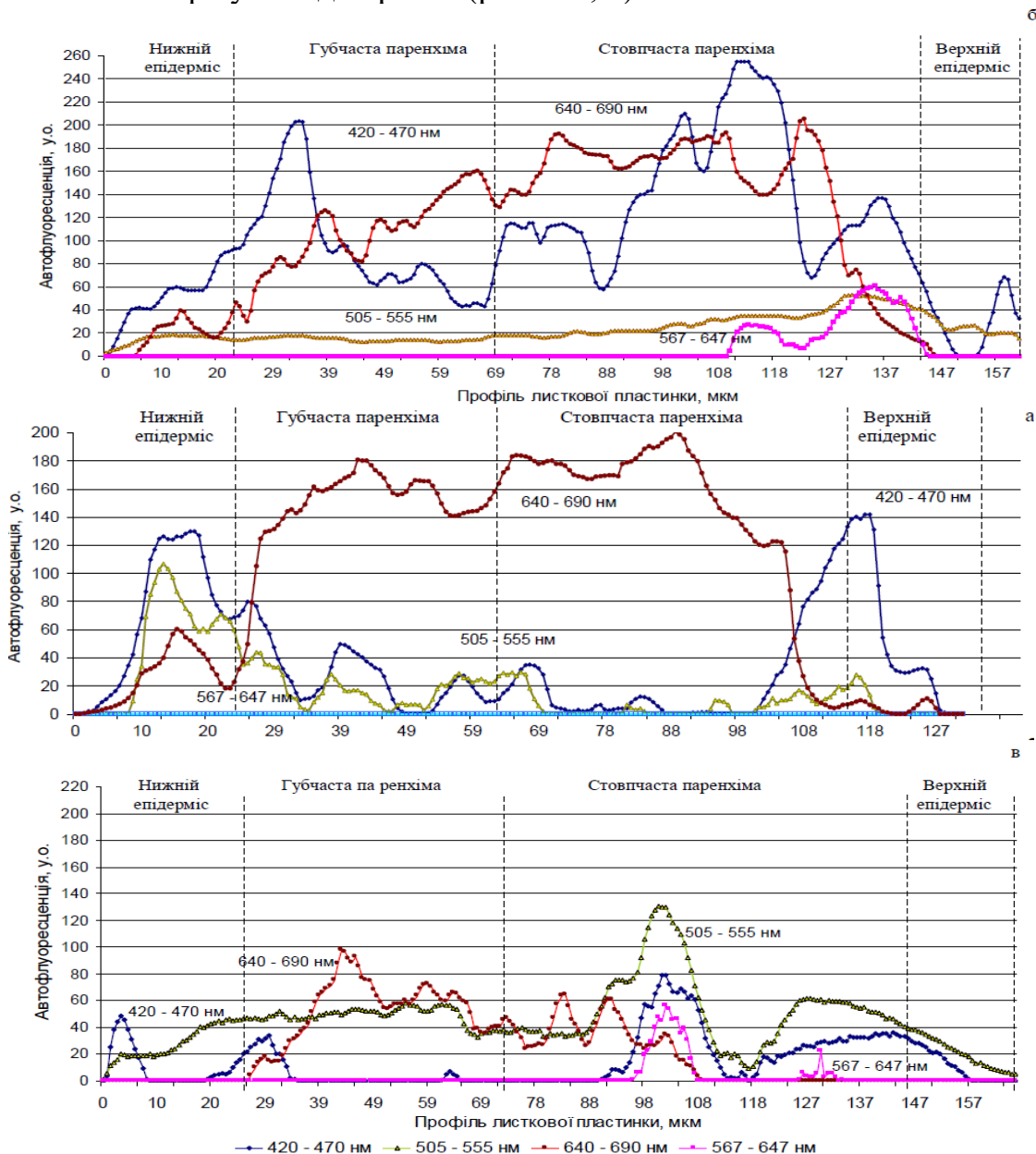


Рисунок 7.5. Лінійний профіль автофлуоресценції метаболітів у тканинах листка *Humulus lupulus* (поперечний розріз): безсимптомний листок (а); початкова (б) та завершальна (в) стадії міжжилкового вірусного хлорозу

На завершальних стадіях розвитку вірусного хлорозу сумарний вміст терпенів і флавоноїдів у верхньому епідермісі підвищується в 3 рази, а в клітинах стовпчастої паренхіми – в 9 (табл. 7.1). Флуоресценція хлорофілу навпаки: спочатку дещо збільшується (на 15–18 % щодо контролю), а потім – поступово зменшується (до 70 %).

Таблиця 7.1

Динаміка вмісту речовин, здатних до автофлуоресценції в листках *Humulus lupulus* під впливом вірусної інфекції

Стадія патологічних змін	Структурні елементи листка	Інтенсивність автофлуоресценції щодо контролю, %			
		420–470 нм	505–555 нм	567–647 нм	640–690 нм
Початковий міжжилковий хлороз	ВЕ*	114,6	443,6	200,1	95,7
	СП	<b>813,0</b>	336,2	<b>1500,0</b>	96,0
	ГП	309,1	72,4	–	69,1
	НЕ	55,5	27,6	–	55,1
	Всього	340,4	164,1	<b>&gt; 1700</b>	117,8
Міжжилковий вірусний хлороз	ВЕ	–	294,2	–	0
	СП	236,5	<b>911,3</b>	324,6	80,8
	ГП	120,1	221,7	–	127,8
	НЕ	23,8	66,0	–	85,9
	Всього	77,5	298,1	324,6	91,4
Міжжилковий вірусний хлороз із ознаками некрозів	ВЕ	26,0	440,2	–	0
	СП	120,8	<b>920,3</b>	<b>611,5</b>	23,0
	ГП	24,4	318,1	–	38,6
	НЕ	13,7	27,3	–	0
	Всього	48,3	320,4	<b>611,5</b>	27,2

Примітка\* ВЕ – верхній епідерміс; СП – стовпчаста паренхіма; ГП – губчаста паренхіма; НЕ – нижній епідерміс; інд – потенційний індикатор вірусної інфекції

Флуоресценція хлорофілу на останніх стадіях змішаного вірусного патогенезу значно ослаблюється. Значно зменшується також флуоресценція тканин листка в синьому спектрі, що може обумовлюватись зменшенням загальної концентрації фенолів і фенолкарбонових кислот у листках, а також їх біохімічною трансформацією в сполуки, які не здатні до світлової емісії [8].

На підставі дослідженої динаміки автофлуоресценції речовин складається уявлення про те, що в системі розподілу фенольних сполук у тканинах листків *Humulus lupulus* існує певна градієнтна структурованість, яка може бути представлена схемою (рис. 7.6).

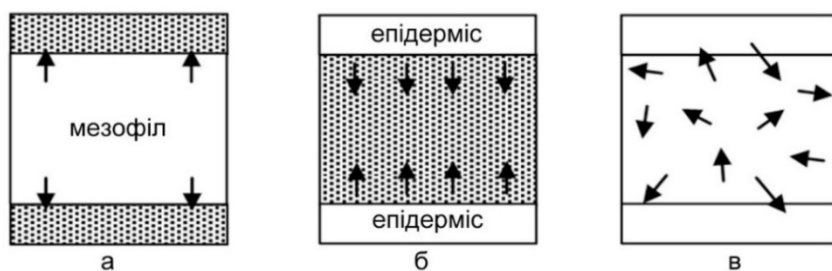


Рисунок 7.6. Вплив вірусної інфекції на перенос і розподіл (показано стрілками) фенольних сполук у тканинах листків: а – здорова рослина, б – початкова стадія вірозу, в – тотальне ураження тканин вірусами (завершальна стадія вірозу)

У предінфекційний період у цілком сформованих листках спостерігається тенденція до переносу фенольних сполук від центрів їхнього синтезу в покривні тканини (клітини верхнього і нижнього епідермісу) (рис. 7.6, а). На початкових стадіях вірозу синтез фенолів у листках значно посилюється, але їх перенос до клітин епідермісу уповільнюється (рис. 7.6, б). Цей фізіологічний процес пов'язаний із неспецифічною захисною реакцією рослинного організму, яка супроводжується зниженням проникності плазмалеми для фенольних сполук, активацією синтезу і відкладенням компонентів лігніну та  $\beta$ -(1-3)-глюканів (калози) у клітинній стінці. На завершальній стадії вірусного хлорозу загальний вміст фенольних сполук, здатних до флуоресценції, зменшується майже удвічі, а їхній розподіл у тканинах листків втрачає системність і набуває дифузного характеру (рис. 7.6, в).

Отже, за специфікою розподілу в тканинах листків здатних до автофлуоресценції оптично активних сполук, можна оцінювати загальний стан рослини, зокрема виявляти вірусні інфекції ще до появи зовнішніх симптомів їхнього ураження. Це має практичну цінність для експрес-діагностики інвазійних патологій рослин на початкових стадіях вірозів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 7

1. Ліханов А.Ф. Антимікробна активність вторинних метаболітів перикарпіїв деяких видів деревних рослин. / Ліханов А.Ф., Білоус С. Ю., Бородай В. В. Лісове і садово-паркове господарство. 2019. № 15. 13 с.
2. Ляшенко Н. И. Физиология и биохимия хмеля. / Ляшенко Н. И., Михайлов Н. Г., Рудык Р. И. Житомир: Полісся. 2004. 408 с.
3. Мельничук М. Влияние вирусной инфекции на цито-гистологическое состояние хмеля (*Humulus lupulus* L.). / Мельничук М., Ліханов А., Григорюк И., Антипов И., Оверченко В., Шульга, В., Клюваденко А. Вестник Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Серия: Биология. 2012. № 62. С. 64–69.
4. Мельничук М. Д. Будова, розвиток і функції секреторної системи *Humulus lupulus* (Cannabaceae). / Мельничук М. Д., Якубенко Б. Є., Ліханов А. Ф. Український ботанічний журнал. 2013. Т. 70. № 3. С. 342–350.
5. Мельничук М. Д. Реакция сверхчувствительности растений при инфицировании фитовирусами. Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології. 2000. № 6. С. 25–28.
6. Шаванова К. Є. Центри походження і філогенетичні зв'язки роду *Aesculus* L. / Шаванова К. Є., Кисельов Д. О., Чеченева Т. М. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2012. № 8. С. 45–52.
7. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа. 2001. 160 с.
8. Likhanov A., Sereda O.V., Gryb V.M., Melnyk V.I., Yuskevych T. Biochemical markers of vital biodestruction in common oak (*Quercus robur* L.) wood. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2019. Vol 11. No 4.
9. Klyachenko O., Likhanov A., Grakhov V. Tissue and biochemical barriers of sugar beet (*Beta vulgaris* L. Provar. Altissima Doell.) pericarp. J. Microbiol Biotech Food Sci. 2018. V.8 (1). P. 663–667. DOI: 10.15414/jmbfs.2018.8.1.663–667.
10. Matousek J., Novak P., Patzak J., Briza J., Krofta K. Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. Rostlinna Vyroba. 2002. Vol. 48. P. 7–14.



## Розділ 8

### ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕДАЧІ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НАСІННЯМ

Передача вірусів насінням – найпоширеніший спосіб зараження рослин [4]. Вірусні частинки в насінні можуть бути локалізовані як у зародках, так і в насінневій шкірці [3]. У зрілому насінні вони виявляються значно рідше, ніж у насінних зачатках, що розвиваються. Для вірусу жовтої мозаїки квасолі (ВЖМФ, *Bean yellow mosaic virus*) відомі випадки, коли вірусні частинки виділялися з зародків квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.), які формуються, однак, не виявлялися в зрілому насінні [2, 6, 30]. Показана також тенденція до зменшення кількості інфікованого насіння при їх тривалому зберіганні [31]. У насінні стійкість вірусів до високих температур значно вища, ніж у вегетативних органах рослин [24]. Так, наприклад, вірус жовтої мозаїки квасолі витримує термообробку насіння до 100 °С, але легко елімінується при незначному нагріванні рослин у культурі *in vitro* [21]. Причини підвищеної стійкості вірусів у насінні мало вивчені та складні для застосування. Існує думка, що це явище зумовлене, насамперед, загальною стабілізуючою дією специфічного структурно-молекулярного складу насіння, зокрема низьким вмістом води та високою концентрацією білків [21].

Серед вірусів, які передаються насінням, щодо підбору модельних систем: насіння – репродуктивна сфера рослини – фітовіруси, значний інтерес представляють віруси жовтої та звичайної мозаїки квасолі [23]. Це одні з найпоширеніших фітопатогенів, що вражають рослини родини Fabaceae та представників інших родин [7, 26, 32, 37].

Щодо насіння лише деякі види заражаються вірусом жовтої мозаїки квасолі ВЖМФ. За існуючими даними, у рослин кормових бобів, інфікованих вірусом жовтої мозаїки квасолі ВЖМФ, від 0,1 до 12,0% насінин містять вірусні частки, у квасолі звичайної – до 40%, у різних видів люпину – до 60%. Є поодинокі повідомлення про передачу вірусу жовтої мозаїки квасолі ВЖМК (вірусу звичайної мозаїки квасолі) (*Bean common mosaic virus*) насінням *Pisum sativum* L. і *Melilotus alba* Medik [30], проте ці дані потребують перевірки.

Відомо, що активний міжклітинний транспорт елементів вірусного геному здійснюється за допомогою транспортних білків, які кодуються вірусом [5]. При змішаних інфекціях можливе явище комплементативної транспортної функції, внаслідок якої залежні віруси, використовуючи транспортні білки вірусу-помічника, долають міжтканинні бар'єри та поширюються на всю рослину [14]. Однак, зважаючи на значні успіхи у розкритті механізмів складання та транспорту вірусів рослин [9, 14], слід зазначити, що ключові результати були отримані при дослідженні вегетативних органів рослин [11, 29]. При цьому структурна організація та розвиток насінних зачатків інфікованих рослин, а також проблема поширення вірусів насінням мало вивчені. У зв'язку з цим особливий інтерес представляють дослідження структурної організації насінних зачатків, їхньої

потенційної здатності перешкоджати проникненню вірусів у насіння, що формуються, а також наявності вірусних включень у тканинах насінних зачатків, насінні, зародків і ендосперму.

Дослідження структурної організації та розвитку насінних зачатків, особливостей транспорту вірусних частинок у тканинах інфікованих рослин проводили на нативному та фіксованому матеріалі квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris*. Модельні рослини квасолі сорту Первомайська отримували зі здорового та інфікованого вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ насіння в контрольованих умовах при 20–23°C та 16-годинному фотоперіоді. Основним об'єктом досліджень слугувала система перенесення фітовірусів із насіння заражених рослин у вегетативні органи та насінні зачатки рослин нової генерації.

Екстракцію сумарної РНК проводили за стандартною методикою [12]. Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 15мкл містила 1 × ПЛР буфер з 1,5 мм MgCl<sub>2</sub> (AmpliSens), 0,2 мм дезоксинуклеозидтрифосфату (дНТФ) (AmpliSens), 1 пкмоль кожного з олігонуклеоти tgtggtacaatgctgtgaagg-3', R - 5'-gccttcacatctgtgctactgct-3', розмір продуктів ампліфікації 391 п.н.) [1, 8], 10-40нг кДНК, 0,5U Taq-полімерази (AmpliSens, Росія). Умови проведення ПЛР аналізу: початкова денатурація кДНК за температури 94 °С – 5 хв; денатурація кДНК 94 °С – 30 с, відпал праймерів 60 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 30 с; кінцева елонгація 72 °С – 7 хв. Кількість циклів – 35.

Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Герцик» ТП4-ПЛР-01. Результати ПЛР візуалізували ультрафіолетовими УФ-променями транслюмінатора (Т-312-С).

Цитологічні та анатомічні дослідження рослинних тканин виконували на постійних мікропрепаратах завтовшки 7-10 мкм. Матеріал для ембріологічних досліджень 24 години обробляли фіксатором Чемберлена [33]. Зрізи тканин фарбували залізним гематоксиліном за Гейденгайном [19]. Вірусні включення виявляли методом флуоресцентної мікроскопії із застосуванням акридинового помаранчевого (розведення – 1:10000) [20]. Час фарбування флуорохромом (при рН – 5,6) та подальшого відмивання тканин насінних зачатків у дистильованій воді – 5 хв. Флуоресценцію нуклеїнових кислот у клітинах гасили 5% розчином трилоцтової кислоти (ТХУ). Для цього ще незабарвлені зрізи обробляли ТХУ 15 хв на водяній бані за 90°C [20]. Для вивчення клітинних оболонок тканини насінних зачатків забарвлювали корифосфіном (1: 1000). Відкладення калози визначали за її флуоресценцією з аніліновим синім.

Електронна мікроскопія. Визначення вірусів та його локалізацію у тканинах симптомних рослин проводили методом електронної мікроскопії з допомогою мідних сіточок із формваром. Препарат контрастували 2% розчином ураніл ацетату та досліджували на електронному трансмісійному мікроскопі JEM 1400.

Фотодокументацію матеріалів та цифрову обробку даних виконували у програмі AxioVision 40V Carl Zeiss. Обробку даних гістохімічних досліджень виконували у спеціалізованій програмі аналізу цифрових зображень – Image-Pro Premier 9.0 (USA).

У польових умовах вірус звичайної мозаїки квасолі ВОМФ викликає у рослин-господарів патологічні зміни листя мозаїчного типу. Хвороба іноді супроводжується різними деформаціями листових пластинок, а в деяких випадках – прогресуючим хлорозом та некротичною плямистістю.

У модельному експерименті характерні ознаки патогенезу були виявлені у проростків квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris*, вирощених з насіння, інфікованих вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ, у фазі формування перших справжніх листків. Листові пластинки інфікованих рослин мали ознаки порушення пігментації. На стадії закладки перших генеративних бруньок на поверхнях листків вздовж жилок першого та другого порядків з'являлися добре виражені хлоротичні плями, площа яких поступово збільшувалася. На стадії зав'язування та розвитку бобів на адаксіальній поверхні листя було виявлено ознаки точкових некрозів, які надалі зливалися у суцільні некротизовані ділянки. Пошкоджене листя скручувалося, передчасно всихало і опадало. Враховуючи умови вегетаційного досвіду (просторова ізоляція корневих систем та пагонів, відсутність комах-переносників), горизонтальне перенесення вірусів від хворих рослин до здорових було виключено. Вертикальне перенесення вірусів у рослинному організмі, як відомо, відбувається за допомогою далекого (пасивний транспорт віріонів з уражених ділянок із потоком асимілянтів по елементах провідної системи у всі тканини рослин, включаючи репродуктивні) та ближнього транспорту (по плазмодесмах – від клітини до клітини) [24]. За характером мозаїки листків, морфологічними ознаками ниткоподібних віріонів розміром 740-760 нм та результатами ПЛР аналізу (рис. 8.1.) патоген ідентифікований як вірус звичайної мозаїки квасолі (ВОМФ) [15, 26, 31].

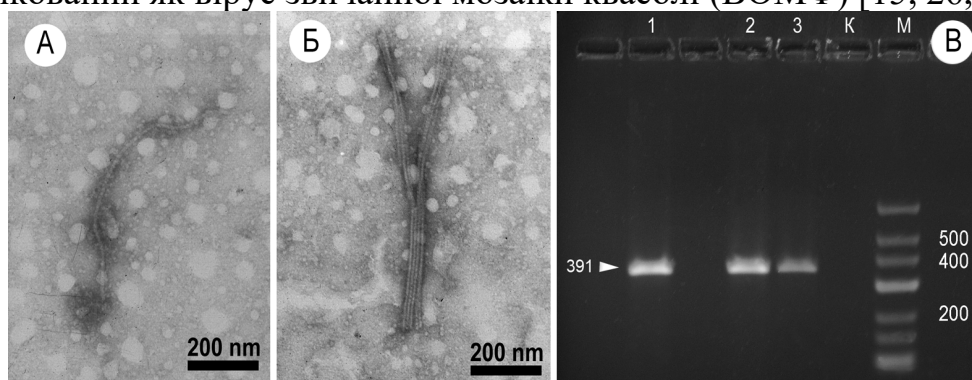


Рисунок 8.1. Віруси звичайної мозаїки бобах квасолі звичайної, які формуються: А – одиночний віріон, виявлений у тканинах насіння, що формується (СМ); Б – група вірусних частинок, виявлена в припліднику (ОК); В – електрофореграма ампліконів розміром 391 п.н., К – негативний контроль; М – маркер молекулярних мас GeneRule SM1193TM

За інтенсивністю флуоресценції продуктів ампліфікації можна припустити, що вміст вірусної РНК у тканинах листа і навколоплідника дещо вищий, ніж у клітинах насіння, що формується (рис. 8.2, б).

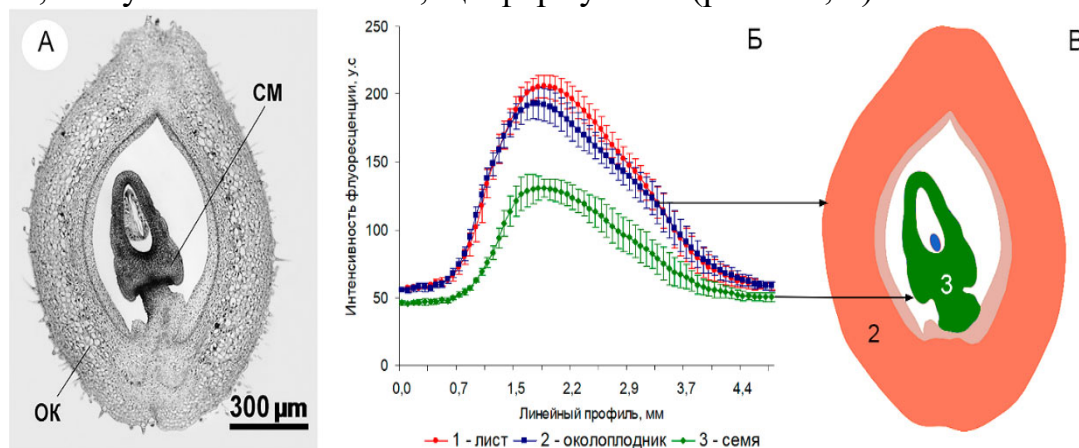


Рисунок 8.2. Розподіл вірусного навантаження на тканини навколоплідника і зародку насіння квасолі з урахуванням тканинних бар'єрів: А – поперечний зріз плоду квасолі, що формується: ок – околоплодник, см – запліднений насінний зачаток; Б – показники інтенсивності флуоресценції продуктів ампліфікації ПЛР, отримані з інфікованого вірусами листа (1), навколоплідника (2) і формується насіння (3); В – схема розподілу вірусного навантаження на плід, що формується.

Отже, у репродуктивних органах квасолі існують та ефективно діють тканинні та клітинні бар'єри, які перешкоджають вільному транспорту вірусних частинок із висхідним потоком макромолекул із інфікованих вегетативних органів.

Для з'ясування шляхів проникнення вірусів у насіння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) значний інтерес представляє здатність квіток до самозапилення, що припускає можливість перенесення фітопатогенів пилюком. Самозапилення у квасолі звичайної відбувається на момент розкриття квіток. За нашими даними квітки інфікованих вірусами рослин дещо дрібніші за здорові. До 20-35% квіток в'януло і опало ще на стадії бутонів. Тим не менш, у хворих рослин навіть на фоні загального зниження показника реалізації репродуктивного потенціалу після самозапилення формувалися повноцінні боби. Динаміка розвитку плодів у інфікованих рослин була дещо уповільненою, проте морфологічно вони мало відрізнялися від здорових. На плаценті зав'язі безсимптомних рослин закладалося в середньому до 5-6 насінних зачатків. У рослин, уражених вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ, кількість повноцінних насінних зачатків зменшувалася вдвічі, а аберантних відповідно збільшувалася. При цьому слід зазначити, що рослини, інфіковані вірусом звичайної мозаїки квасолі, цвіли та формували повноцінні боби. Таким чином, у відносно сприятливих умовах: при постійній температурі ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) та вологості повітря ( $70 \pm 5\%$ ), достатньому для вегетації рівні освітлення (5–7 кЛк) рослина квасолі, інфікована вірусом

звичайної мозаїки квасолі ВОМФ, здатна частково або повністю реалізувати репродуктивну функцію.

Життєздатність насіння, при допустимому вірусному навантаженні, багато в чому обумовлена структурною організацією насінних зачатків до та після його запилення. Дослідження генеративних органів квасолі показали, що у нормі насінний зачаток у *Phaseolus vulgaris* кампілотропного типу [38], крассинуцелятний, бітегмальний. Внутрішній інтегумент тришаровий (клітини 17-25 мкм), зовнішній – масивний багатошаровий, з боку рафе – 100-120 мкм, антирафе – 45-50 мкм. Мікропилі вигнуте або зигзагоподібне, утворюється обома інтегументами. У мікропілярній ділянці клітини епідерми зовнішнього інтегументу перетворюються на секреторні. Виділяючи біологічно активні речовини, секреторні клітини стимулюють проростання пилкової трубки та сприяють її входженню у простір мікропілярного каналу. Внутрішній епідерміс внутрішнього інтегументу на момент запліднення насінних зачатків трансформується в інтегументальний тапетум (ендотелій). Його клітини поступово витягуються у радіальному напрямку, а цитоплазма стає більш зернистою та густою, ядра дрібні – до 7–8 мкм. Клітини шару, що підлягає, залишаються дрібними таблитчастими, з дещо подовженими периклінальними стінками. Межа між внутрішнім та зовнішнім інтегументами зазвичай виражена слабо. Фунікулус насінного зачатка масивний і короткий (140-160 мкм), зі слабо вираженим фунікулярним обтуратором, поруч з яким диференціюється невеликий плацентарний обтуратор. Нуцеллус грушоподібний (у широкій частині до 200 мкм), дещо вигнутий у мікропілярній зоні. У його апікальній ділянці утворюється нуцелярний ковпачок. Клітини ковпачка 7-8 мкм з ядрами, багатими на хроматин. Після запліднення його клітини зберігаються тривалий час і, ймовірно, на початкових стадіях розвитку зародка виконують гаусторіальну функцію. У базальній області нуцеллуса диференціюється подіум та постамент. Зовнішні та внутрішні периклінальні стінки клітин (30-35 мкм) епідермісу середньої зони нуцеллусу покриті товстою кутикулою. До запліднення вони більші за клітини халазальної зони (10-15 мкм), які після запліднення сильно витягуються, вакуолізуються і покриваються калозою (флуоресціює з аніліновим синім). Клітини базальної області нуцеллуса дерев'яніють і інкрустуються компонентами М-лігніну. У рослин, інфікованих вірусами, процес відкладання на клітинних стінках біополімерів відбувається значно інтенсивніше, що підтверджується результатами флуоресцентної мікроскопії (рис. 8.3 а-в).

В основі нуцеллусу та внутрішнього інтегументу, на кордоні з халазою, формується гіпостаза. Насінний зачаток після запліднення стає кампілотропним насінням [36]. Найбільш інтенсивно розростаються тканини із боку рафе. На стадії формування глобулярного зародка зовнішні та внутрішні периклінальні стінки клітин зовнішньої епідерми утворюють товсті шари кутину. Особливо великі його відкладення (до 12 мкм на зовнішніх стінках та 4–6 мкм – на внутрішніх) проглядаються у фунікулярній зоні.



Провідний пучок із плаценти через фунікулус підходить до масивної халази. Клітини проваскулярного пучка на момент запліднення насінного зачатка диференціюються у великі (до 6–8 мкм у діаметрі) трахеїди зі спіральними потовщеннями. Нижче провідного пучка в халазальній частині, виявлена система багатоклітинних нечленистих утворень (довжина клітин – 60-70 мкм, ширина – 10-12 мкм).

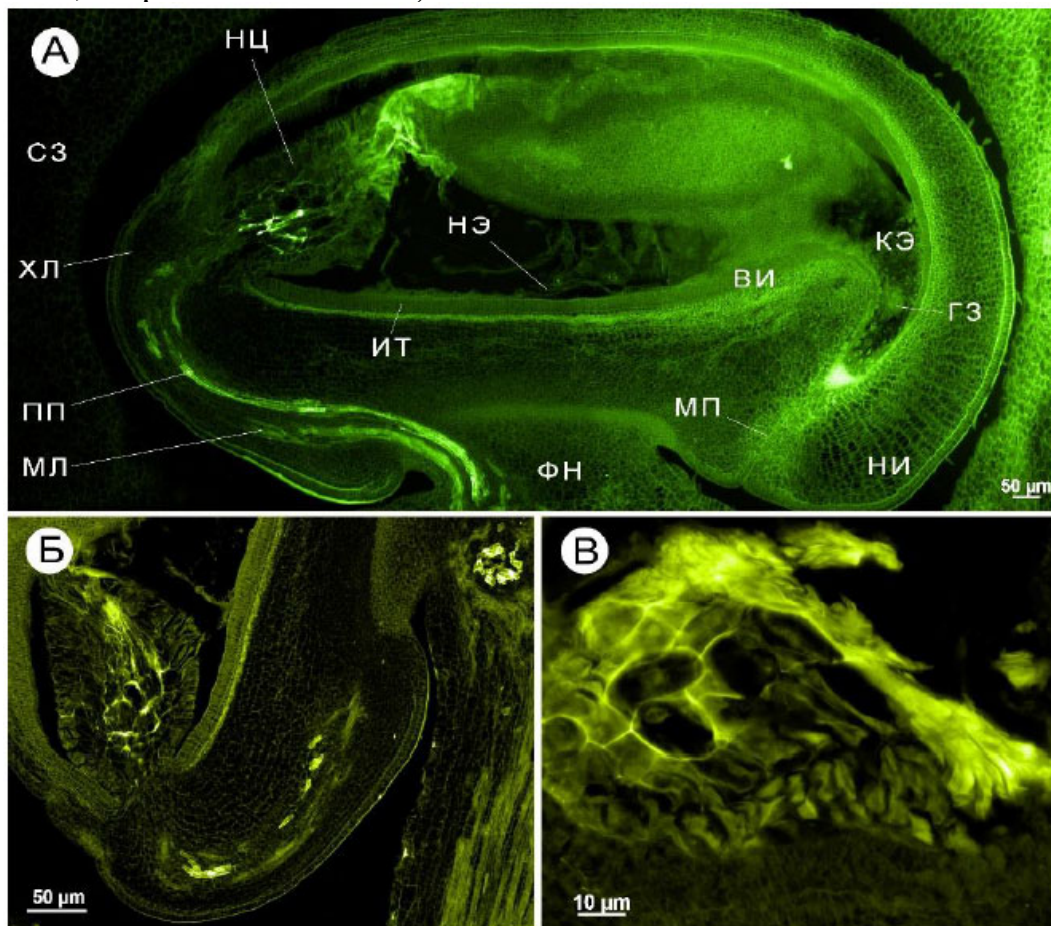


Рисунок 8.3. Флуоресценція клітин та тканин насінних зачатків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) (поздовжний латеральний розріз): А – загальний вигляд насінного зачатка: нц – нуцелус, не – нуклеарний ендосперм; сз – стінка зав'язі; пп – провідний пучок; тр – трахеїди; фн – фунікулус; пр – паренхіма; гз – глобулярний зародок; ит – інтегументальний тапетум; ви – внутрішній інтегумент; ні – зовнішній інтегумент; мл – млечники; хл – халаза. Б, У – відкладення лігніну в нуцелярному бар'єрі; фарбування корифосфіном (1: 1000)

Присутність у васкулярній системі генеративних органів вірусних частинок індукує специфічні перетворення паренхіми (інкрустація оболонок клітин лігніном), що прилягає до провідних тканин (рис. 8.4, в-г). Той факт, що інтенсивне відкладення конституційних речовин виявлялося в живих тканинах структурних елементів насінного зачатку вздовж основних потоків транспорту поживних речовин, визначає високу чутливість рослин до



патогенів та виявляє найімовірніші шляхи проникнення вірусів у тканини зародку, насіння та плода.

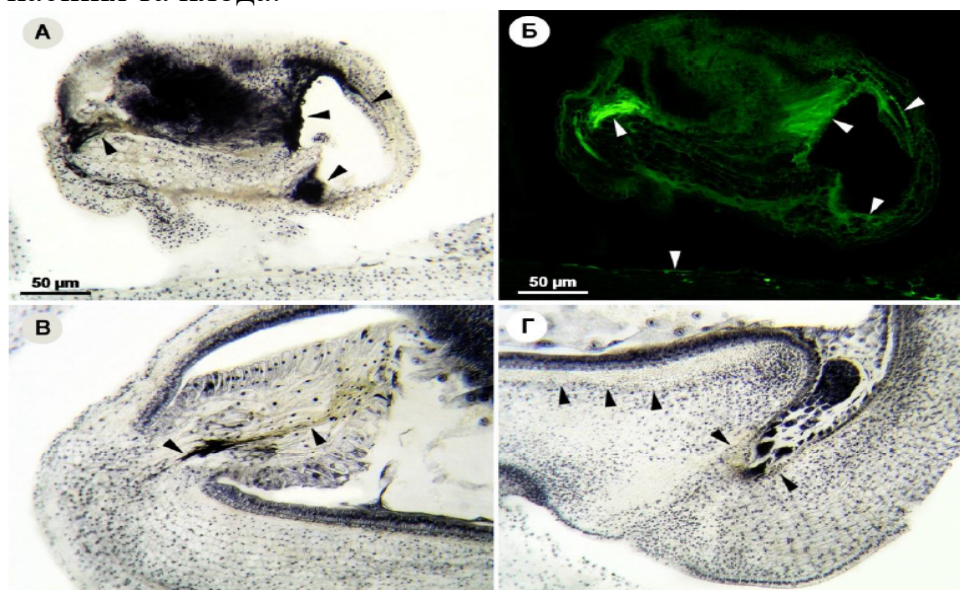


Рисунок 8.4. Відкладення лігніну та калози в тканинах насінних зачатків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) (подовжний латеральний розріз): А–Б – вірус індукована деградація насінного зачатка з проявом реакції надчутливості (стрілками показані тканини зі значними відкладеннями фенольних речовин, лігніну) Б – фарбування аніліновим синім (1: 1000), В – відкладення лігніну в провідній зоні нуцеллуса, Г – відкладення лігніну в мікропілярній зоні насінного зачатка та внутрішньої частини зовнішнього інтегументу (показано стрілками)

Враховуючи, що пучки, які проводять, пронизують тканини зовнішнього інтегументу, вірусні частинки можуть безперешкодно проникати в апікальну зону насіння, де знаходиться зародок. За високої концентрації вірусні частинки долають внутрішні тканинні бар'єри насіння, що формуються, і довго зберігаються в його тканинах, викликаючи реакції надчутливості, які завершуються деградацією тканин репродуктивних органів. У перикарпії інфікованих рослин виявлялося збільшення загальної кількості ідіобластів, наповнених поліфенольними сполуками. За інтенсивністю накопичення в тканинах інфікованих насінних зачатків квасолі продуктів вторинного метаболізму в нуцелусі виділяється кілька зон (рис. 8.4, а-б показано стрілками): халазальна, базальна і мікропілярна. Значна лігніфікація та суберинізація клітинних стінок найбільш виражена у пошкоджених насінних зачатках. У таких умовах симпластний транспорт макромолекул та транслокація вірусних частинок із клітин прилеглих соматичних тканин суттєво утруднюється.

Важливою діагностичною ознакою присутності в рослинах вірусу звичайної мозаїки квасолі ВОМФ є утворення живих клітин особливих включень – нуклеопротейдних комплексів. Вірусні включення є ізометричними кристалами 0,4 – 0,8 мкм у поперечнику та овальними зернистими тільцями розміром 2 – 6 мкм, які демонструють характерні хімічні

реакції на білок [20]. При дослідженні інфікованих насінних зачатків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) методом флуоресцентної мікроскопії у структурі ядер та цитоплазмі клітин зовнішньої епідерми та середнього шару внутрішнього інтегументу нам вдалося виявити характерні для вірусу звичайної мозаїки квасолі овальні зернисті включення (рис. 8.5.).

Обробка тканин насінних зачатків гарячою (90°C) трихлороцтовою кислотою дозволила повністю погасити світіння нуклеїнових кислот у ядрах і ядерцях та значно посилити світіння білкових включень (рис. 8.5, а). У окремих клітинах зернисті включення вірусів утворювали невеликі агрегації розміром – 2,8 – 3,0 мкм. В ендотелії вони зустрічалися значно рідше (рис. 8.5, в). У клітинах нуцеллусу та ендосперму вірусних включень не виявлено (рис. 8.5, а, в). Найбільша кількість клітин (до 20-27%) з вірусними включеннями була виявлена у зародку та суспензорі (рис. 8.5, б, г). У клітинах нуцеллуса апікальної зони насінного зачатка, що оточують зародок, виявлено активне світіння протопласту без специфічних включень, що може бути пов'язане з формуванням мікропілярного бар'єру, який перешкоджає переносу вірусних частинок.

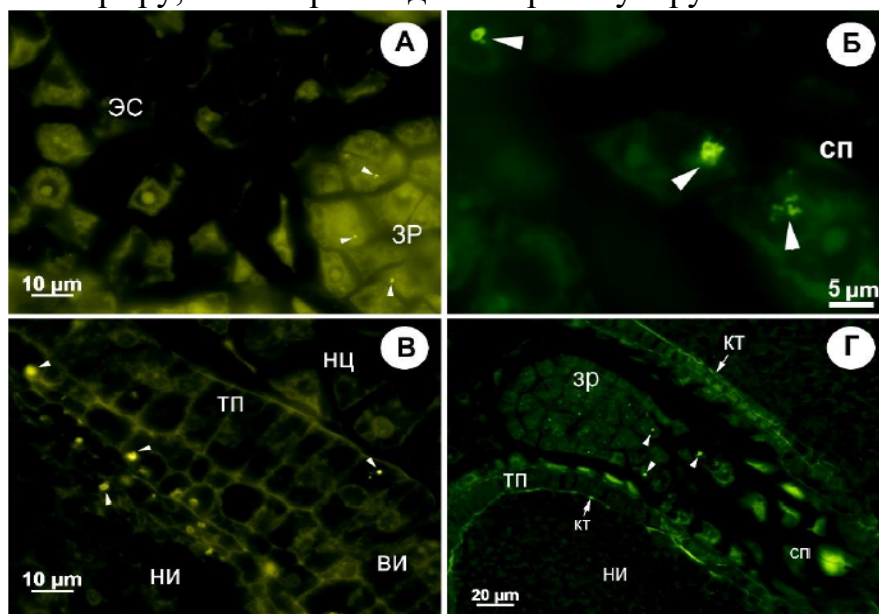


Рисунок 8.5. Вірусні включення в тканинах зародку та насінного зачатка квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*): А – локалізація ядерних вірусних включень у зародку та їх відсутність у ендоспермі; Б – дифузні вірусні включення у клітинах суспензора; В – вірусні включення у зовнішніх шарах клітин внутрішнього інтегументу; Г – утворення кутикули та локалізація вірусних включень у базальній частині зародку; ТП – інтегументальний тапетум, КТ – відкладення кутину на зовнішніх та внутрішніх периклініальних стінках ендотелію; НИ – зовнішній інтегумент; ВИ – внутрішній інтегумент, НЦ – нуцелус; ЗР – зародок; ЕС – ендосперм; СП – суспензор; стрілки показані вірусні включення. Фарбування акридиновим помаранчевим (1:10 000)

Особливості світіння клітинних стінок у тканинах насінних зачатків підтверджують їхню просторову гетерогенність. Так, інтенсивність

флуоресценції зовнішніх стінок у клітинах інтегументального тапетуму була вдвічі вищою, ніж тангентальних стінок (рис. 8.6, а).

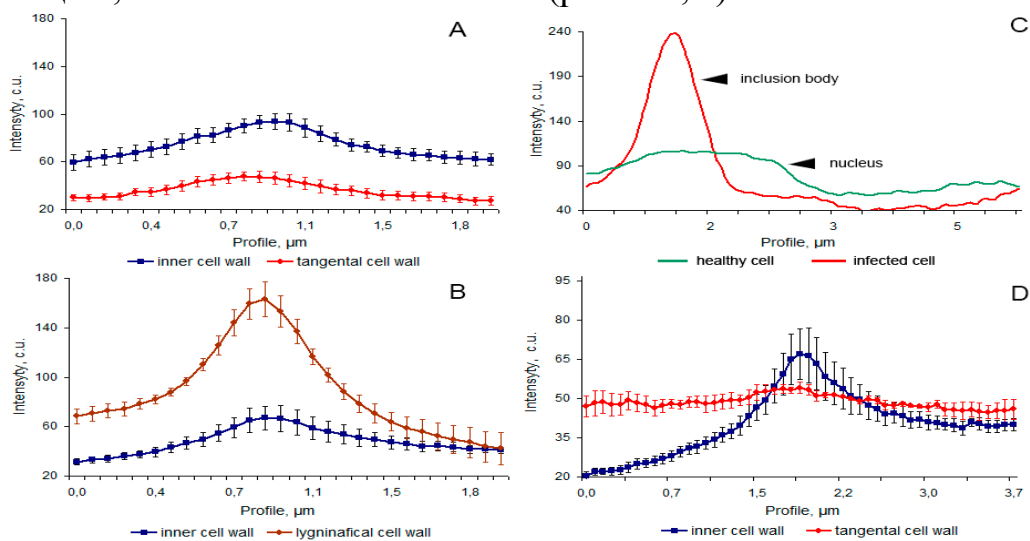


Рисунок 8.6. Флуоресценція клітинних стінок та внутрішньоклітинних структур у насінних зачатках квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*): А – зовнішні та внутрішні клітинні стінки інтегументального тапетуму; С – інфікована клітина з вірусним включенням та здорова клітина зародка; В – відкладення лігніну в нуцелярному бар'єрі; D – зовнішні та тангентальні клітинні стінки нуцеллусу; фарбування корифосфіном (1: 1000)

При цьому інтенсивність світіння біополімерів у зовнішніх та тангентальних стінках епідерми нуцеллусу суттєво не відрізнялася (рис. 8.6, d). Яскрава флуоресценція була характерною для клітин, задіяних у транспорті метаболітів від гіпостазу через постамент-подіум у зародковий мішок. У лігніфікованих ділянках тканин клітинні стінки флуоресціювали в 2,5 рази інтенсивніше, ніж зовнішні клітинні стінки (рис. 8.6, b). Це підтверджує накопичення в них біополімерів, у тому числі фенольної природи, які створюють тканинний бар'єр та перешкоджають транслокації вірусних частинок у клітини ендосперму та далі – до зародка. На фоні цитоплазми найінтенсивнішим було світіння вірусних включень. Після фарбування акридиновим помаранчевим їхня флуоресценція, порівняно з вмістом ядерного апарату, була яскравішою в 2,3–2,4 рази. Це дозволяло їх чітко ідентифікувати (рис. 8.6, c).

Відомо, що поліпротеїни в ядрах представлені малими (N1a) та великими (N1b) ядерними включеннями [16, 34]. Їхнє інтенсивне накопичення в ядрах зародка може свідчити про зниження активності відповідних протеїназ. Навпаки, у клітинах інтегументального тапетуму включення виявляли у протопластах клітин інтегументів. Відповідно до сучасних уявлень у цитоплазмі локалізуються аморфні (AI) та циліндричні (CI) вірусні включення. Вважається, що останні мають здатність регулювати просвітлення плазмодесмових каналів, і відповідальні за транслокацію потивірусів від

клітини до клітини [27]. Однак, тканини насінних зачатків квасолі організовані таким чином, що перенесення вірусів та інших фітопатогенів за симпластом з однієї тканини в іншу утруднений. Це пов'язано з особливостями розташування та станом плазмодесмових каналів, а також значними відкладеннями біополімерів на межі прилеглих тканин.

У сприйнятливих сортів передача вірусів від материнської рослини до зародка може відбуватися у мікропілярній зоні при контакті клітин суспензору з клітинами ендотелію на початкових стадіях розвитку [22]. При цьому допускається, що навіть незначної кількості вірусних частинок достатньо для їх проникнення в основу суспензора до початку його дегенерації [17]. У крассинуцеллятних насінних зачатків основний шлях транспорту речовин проходить базально по добре диференційованій провідній системі через гіпостазу в халазальну зону нуцеллуса, і далі – апопласту через клітини антипод в ендосперм і зародок [36].

Проникнення вірусних частинок у генеративну клітину на стадії мегаспорогенезу може блокуватись відкладеннями калози [36]. На стадії розвитку зародкового мішка метаболіти накопичуються в соматичних клітинах насінного зачатка. Стінка зародкового мішка – це цілісна структура, яка функціонує як єдиний апопласт [37]. Вона проникна виключно для низькомолекулярних речовин та іонів, що перешкоджає проникненню вірусного геному та віріонів безпосередньо у зародковий мішок.

Таким чином, циркуляція вірусів у насінних зачатках і насінні квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), яке розвивається, відбувається, головним чином, по базальному шляху через провідний пучок з навколоплідника в халазальну область насінного зачатка і звідти через гіпостазу в нуцеллус (рис. 8.7.). Далі вірусні частинки здатні переміщатися у тканини зовнішнього та внутрішнього інтегументу (з обмеженням у тканині інтегументального тапетуму, де вірусні включення утворюються дуже рідко).

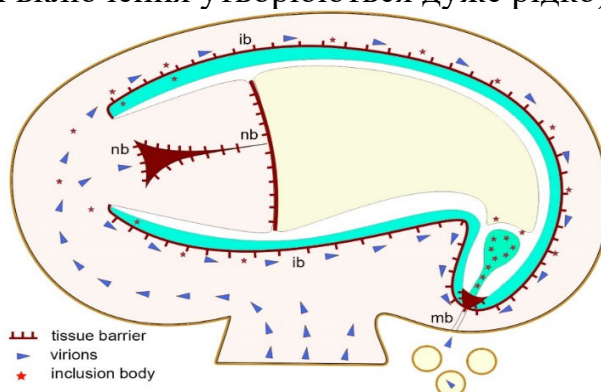


Рисунок 8.7. Обмеження транспорту вірусів тканинними бар'єрами насінних зачатків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*): nb – нуцелярний бар'єр; ib – інтегументальний бар'єр; mb – мікропілярний бар'єр

Цей шлях транслокації вірусів від материнської рослини до зародка на стадії проембрію, на нашу думку, найбільш можливий [28]. Крім того, значна



концентрація вірусних включень у клітинах зародка може свідчити про ймовірність його зараження вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ внаслідок перенесення інфікованим пилком [13, 10], що є одним із способів подолання вірусами тканинних бар'єрів насінного зачатка.

Наостанок слід зазначити, що системна вірусна інфекція впливає на регуляцію активності генів у рослині. Зміни активності транскрипції та трансляції залежать від сорту рослини, від штаму вірусу та швидкості його рекомбінації, зокрема у процесі генетичного обміну між різними вірусами в інфікованій клітині-господарі [18, 29, 36]. У свою чергу, і вірусні патогени здатні підвищувати гомологічну рекомбінацію у інфікованих рослин задовго до проникнення в клітини, що пояснюється наявністю у вищих рослин ефективною системою рекомбінаційного сигналіngu [25]. Таким чином, передача вірусів насінням у інфікованих рослин відбувається на фоні комплексу захисних реакцій, які можуть суттєво вплинути на способи транслокації вірусів, їх реплекативну активність та стабільність.

В умовах некритичного вірусного навантаження рослини квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) успішно запилюються та утворюють повноцінні плоди та насіння, частина з яких інфікована вірусами звичайної мозаїки квасолі (ВОМФ).

Встановлено, що у рослини квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), інфікованої вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ, розвиток репродуктивних органів залежить від концентрації вірусних частинок у соматичних тканинах: при низькому навантаженні вірусних частинок формуються тканинні бар'єри, що перешкоджають транспорту вірусів; при високому навантаженні вірусних частинок розвивається типова реакція надчутливості, що викликає деградацію насінних зачатків [28].

В інфікованих вірусом звичайної мозаїки квасолі ВОМФ насінних зачатках квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) в ядрах і цитоплазмі клітин зовнішньої епідерми, а також у середньому шарі внутрішнього інтегументу, виявлено характерні для вірусу звичайної мозаїки квасолі ВОМФ овальні зернисті вірусні включення. Найбільша кількість включень (від 20 до 27%) спостерігалася в клітинах зародка та суспензора. При цьому в ендотелії нуклеопротейнові включення зустрічалися значно рідше, а в клітинах нуцеллусу та ендосперму вони не виявлені.

Показано, що транслокація вірусних частинок у насінних зачатках квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) може відбуватися: далеко-дистантним шляхом за розвиненою васкулярною системою з плаценти інфікованої рослини через фунікулус до халазальної зони, де подальше пересування вірусів через клітини гіпостазу та подіуму блокується; коротко-дистантним шляхом – за симпластом з клітини в клітину (блокується мікропілярним та інтегументальним бар'єрами) а також у процесі само- або перехресного запилення квіток інфікованим пилком [28].

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДО РОЗДІЛУ 8

1. Васюкова Н. И. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота. / Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л. Прикладна біохімія і мікробіологія. 2007. Т. 43, № 4. С. 405–411.
2. Мельничук М. Д. Будова, розвиток і функції секреторної системи *Hutulus lupulus* (*Cannabaceae*). / Мельничук М. Д., Якубенко Б. Є., Ліханов А. Ф. Український ботанічний журнал. 2013. Т. 70. №3. С. 342–350.
3. Мельничук М. Д. Реакция сверхчувствительности растений при инфицировании фитовирусами. Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології. 2000. № 6. С. 25–28.
4. Поліщук В. П. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанінська, С. М. Рижук, В. П. Патица, А. Л. Бойко К.: «Фітосоціоцентр», 2001. С. 16.
5. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа, 2001. 160 с.
6. Шевякова Н. И. Влияние засоления на содержание полиаминов и фитогормонов в проростках *Phaseolus vulgaris* L. / Шевякова Н. И., Мусатенко Л. И., Стеценко Л. А., Веденичева Н. П., Войтенко Л. В., Ракитин В. Ю., Сытник К. М., Кузнецов В. В. Доповіді НАН України. 2009. № 12. С. 180–185.
7. Agrios G. *Plant pathology* – 5th ed., Elsevier Academic Press, 2005, pp. 723–824.
8. Antipov. I.O., Hrynychuk K.V., Duplyak O.T. Rozrobka PLR–system dlia identyfikatsii virusu zvychnoi mozaiky kvasoli (Bean common mosaic virus), *Nauk. visnik Natsionalnogo un–tu bioresursiv i prirodokoristuvannya Ukrayiny. Seriya: biologiya, biotekhnologiya, ekologiya*, 2016, vup. 234, ss. 40–46.
9. Atabekov J.G., Dorokhov Y.L.. Plant virus–specific transport function and resistance of plants to viruses, *Advances in Virus Research*, 1984, vol. 29, pp. 313–364. doi:10.1016/s0065–3527(08)60412–1.
10. Bennett C.W. Seed transmission of plant viruses, *Advances in Virus Research*, 1969, vol. 14, pp. 221–261. doi:10.1016/s0065–3527(08)60561–8.
11. Boiko A.L., Silaeva A. M., Mishchenko L.T., Reshetnik G.V. Peculiarities of ultrastructural organization of the winter wheat mesophyll cells under conditions of virus infection, *Citologija i genetika*, 1997, vol. 31 (5), ss. 71–78.
12. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, pp. 495 – 503. PMID: PMC269651.
13. Card S.D., Pearson M.N., Clover G.R.G. Plant pathogens transmitted by pollen, *Australasian Plant Pathology*, 2007, vol. 36 (5), pp. 455–461. doi:10.1071/ap07050.
14. Dodds J.A., Hamilton R.I. Structural interactions between viruses as a consequence of mixed infections, *Advances in Virus Research*, 1976, vol. 20, pp. 33–86. doi: 10.1016/S0065–3527(08)60501–1.



15. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. [et al], *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*, The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA. USA.: Elsevier Academic Press., 2005. p. 1162.
16. Flores–Estevez N., Acosta–Gallegos J.A., Silva–Rosales L. Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico, *Plant Disease*, 2003, vol. 87, No. 1 pp 21–25. doi:10.1094/pdis.2003.87.1.21.
17. Folsom M.W., Cass D.D. Changes in transfer cell distribution in the ovule of soybean after fertilization, *Canad. J. Bot.*, vol. 64, no.5. pp. 965–972. doi:10.1139/b86–130.
18. Froissart R., Roze D., Uzest M., Galibert L., Blanc S., Michalakis Y. Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection, *PLoS Biology*, 2005, vol. 3, Is. 3, pp.389–395. doi:10.1371/journal.pbio.0030089.
19. Furst H.H. *Metodi anatomo–hystokhymycheskoho yssledovanyia rastytelnikh tkanei*, Moscow: Nauka, 1979, ss. 40–65.
20. Holdyn M.Y. *Vyrusnie vklucheniye v rastytelnoi kletke y pryroda vyirusov*, Moscow: Yzd–vo AN SSSR, 1963, 204 s.
21. Hull R. *Matthews' plant virology*, 4th ed. Academic Press, San Diego, 2001, pp.546–581.
22. Jossey S., Hobbs H.A., Domier L.L. Role of soybean mosaic virus–encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean, *Phytopathology*, 2013, vol.103, pp. 941–948. doi:10.1094/phyto–09–12–0248–r.
23. Kehler Kh., Kliinkhempel Kh., Mertel K. y dr., *Borba s vyirusnymi bolezniamy rastenyi*, Moscow: Ahropromyzzdat, 1986, 479 s.
24. Kiraly L., Barna B., Kiraly Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance, *Phytopathology*, 2007, vol.155, pp.385–396. doi: 10.1111/j.1439–0434.2007.01264.x
25. Kovalchuk I., Kovalchuk O., Kalck V., Boyko V., Filkowski J., Heinlein M., Hohn B., Pathogen–induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements, *Nature*, 2003, vol.423 (6941), pp.760–762. doi:10.1038/nature01683.
26. Kyrychenko A.M., Kovalenko O.H. Zvychaina mozaika kvasoli na Kyivshchyni: etiolohiia khvoroby ta identyfikatsiia zbudnyka, *Mikrobiolohichniy zhurnal*, 2018, T.80, № 4, ss. 96–107. doi:10.15407/microbiolj80.04.096.
27. Lee J.Y., Lucas W.J., Phosphorylation of viral movement proteins: regulation of cell–to–cell trafficking, *Trends Microbiol*, 2001, vol. 9, pp. 5–8. doi:10.1016/s0966–842x(00)01901–6.
28. Likhanov A.F., Antipov I. A., Hrynchuk K. V., Dragovoz I. V. Formation of Cell and Tissue Barriers in *Phaseolus vulgaris* L. Ovules in a System of Antiviral Resistance. *Cytology and Genetics*. 2020, 54, 103-110.
29. Martin K., Singh J., Hill J.H., Whitham S.A., Cannon S.B. Dynamic transcriptome profiling of Bean Common Mosaic Virus (BCMV) infection in

Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *BMC Genomics*, 2016, vol.17(613), pp. 1–19. doi:10.1186/s12864-016-2976-8.

30. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Shcherbatenko I.S. Phylogenetic analysis of Ukrainian seed-transmitted isolate of Soybean mosaic virus, *Biopolymers and Cell*, 2018, vol. 34, no 3, pp. 229–238. doi: 10.7124/bc.00097D

31. Moskovets S. M., Kraiev V. H., Poremska N. B., Bilyk L. H., Baratova D. F. *Virusy i virusni khvoroby bobovykh kultur na Ukraini*. K.: Nauk. dumka, 1971, 150 s.

32. Mysil M., Kvicala B.A., Leskova O. *Diagnostika virusov strukovin a datelinovin*, Bratislava: VEDA vydavatelstvo Slovenskej akademie vied, 1981, 180 s.

33. Pausheva Z.P. *Praktykum po tsytolohyy rastenyi*, 4–e yzd., pererab. y dop., Ahropromyzdat, 1988, 271 s.

34. Revers F., Gall O., Candresse T., Maule A.J., New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 1999, vol. 12 (5), pp. 367–376. doi:10.1094/mpmi.1999.12.5.367.

35. Roberts I.M., Wang D., Thomas C.L., Maule A.J. Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance, *Protoplasma*, 2003, vol. 222, pp. 31–43. doi:10.1007/s00709-003-0015-5.

36. Shamrov I.I. *Semiazachatok tsvetkovikh rastenyi: stroenye, funktsyy, proyskhozhdjenje*, Moscow: Tov–vo nauch. yzd. KMK, 2008, 350 s.

37. Shevchenko Zh. P. *Virusni ta mikoplazmovi khvoroby polovykh kultur*, K.: Urozhai, 1995, 300 s.

38. Sravnytelnaia anatomyia semian, T.4., Dvudolnie. Dilleniidae / pod. red. A.L. Takhtadzhiana., SPb.: Nauka, 1992, ss. 374–376.

## ВИСНОВКИ

У монографії висвітлені теоретичні узагальнення й експериментальні результати, які у сукупності розкривають нові аспекти метаболічних процесів рослинних організмів, що пов'язані з адаптаційними пристосуваннями до дії несприятливих чинників природного середовища в умовах зміни клімату. Зокрема, отримано такі результати:

1. Нині за умов глобальних кліматичних змін та зростання антропогенного тиску, які діють як стрес-фактори на рослинні організми, у рослин активізуються різні механізми адаптації, які спрямовані на регуляцію метаболічних процесів для нормалізації гомеостазу. Надійність системи захисту рослинного організму проти дії стрес-факторів залежить від адаптивного потенціалу всіх рівнів її організації.

2. Важливою складовою системи адаптації і захисту рослин в умовах абіотичного і біотичного стресу є фенольні сполуки. Різні класи фенольних сполук виконують неспецифічні і специфічні адаптивні функції. Для визначення загальної та індивідуальної адаптивної стратегії окремих рослин, видів або гібридів варто використовувати динаміку зміни показників у часі та індексів співвідношення наявної кількості певних класів вторинних метаболітів, синтез яких пов'язаний із різними ферментними системами.

Амплітуда вертикальної (ярусної) мінливості рівня накопичення фенольних сполук у листках деревних рослин є показником чутливості рослинного організму до градієнту екологічних чинників або їхньої адитивної дії. Для рослин інтродуцентів, за умов їхнього стабільно активного росту і розвитку в межах оптимуму, значення вертикальної мінливості є показником їхнього інтродукційного потенціалу. Встановлено, що в рослин *Aesculus hippocastanum* індекс співвідношення вмісту флавоноїдів до загальних фенолів, і катехинів має обернену залежність від висоти ярусу крони. Це свідчить про те, що основними протекторами і регуляторами надлишкової інсоляції, перепадів вологості і добової температури є гідролізовані і конденсовані таніни. Флавоноїди, які синтезуються в меншій кількості виконують регуляторні та репараційні функції у разі порушення цілісності тканин і органів. У відповідь на ушкодження у листках активізується синтез флавоноїдів. Ця реакція описується логнормальною залежністю і має п'ять стадій: інерції (I), повільного (II) і активного (III) зростання кількості флавоноїдів, стадії насичення (IV) і повільного повернення до базового рівня (V), обумовленого внутрішніми і зовнішніми чинниками.

3. Фітохімічні профілі фенольних комплексів є надійним інструментом ідентифікації рослин на рівні родини

4. Будова і функції внутрішньої секреторної системи пагонів *Humulus lupulus* синхронізовані з вторинним метаболізмом, який залежить від фази розвитку рослини. Секреторні тканини вегетативних і генеративних органів *Humulus lupulus* активно накопичують фенольні сполуки, стабілізовані полісахаридами (пектинові речовини та геміцелюлози), з регуляторною й антимікробною активністю. З'ясовано, що секреторні канали стебел трав'яних

рослин *Humulus lupulus* формуються на ранніх стадіях розвитку і пов'язані з просторовою орієнтацією пагонів і листків через регуляцію ростових процесів через видовження і скручування стебел.

5. Комплексні морфо–фізіологічні, анатомічні та біохімічні дослідження сортів малини української селекції підтверджують високу ефективність застосування біотехнологічних методів оздоровлення та мікроклонального розмноження рослин, які в процесі культивування *in vitro* та ступінчастої адаптації *in vivo* виявляють значний адаптаційний потенціал і високу продуктивність, що розкриває широку перспективу запровадження в Україні ягідництва на сучасному європейському рівні.

Встановлено, що оксикоричні і оксибензойні кислоти у концентрації 1мМ/л активно впливають на фенілпропаноїдний синтез рослин *in vitro* та виконують функції неспецифічних регуляторів росту. У листках *Vitis vinifera* ферулова кислота стимулює синтез стильбеноїдів, які виконують функції фітоалексинів і захищають рослинний організм проти фітопатогенів. Встановлено механізм, за яким за умов ферментативного гідролізу клітинних стінок листків *Vitis vinifera* відбувається вивільнення ферулової кислоти і запускаються процеси, які призводять до збільшення в рослинних тканинах концентрації резвератрола та інших стильбеноїдів.

Фізіологічна активність оксибензойних і оксикоричних кислот залежить від кількості та положення замісників. Електронодонорні замісники першого роду (метильні і гідроксигрупи) посилюють калюсогенез у рослин *in vitro*. Ферулова та сирінгова кислоти, до складу яких входять відповідно одна і дві метоксигрупи, стимулюють синтез фенольних сполук, а збільшення кількості гідроксигруп у структурі ароматичного кільця (галова кислота) навпаки уповільнюють фенольний синтез, що особливо актуально для культури *in vitro*. Утім реакції різних видів рослин на фенолкарбонові кислоти є специфічними, а їхня інтенсивність і прояв може суттєво вирізнитись.

Наявність індивідуальних фенолкарбонових кислот у тканинах рослин навіть у мікромольних концентраціях може істотно впливати на їхню функціональність.

6. Вторинні метаболіти, такі як фенольні сполуки здатні знижувати ефективність ферментативного гідролізу грибами деревини та збільшувати витрати на отримання кінцевого продукту в біосинтезі етанолу, чим саме сприяти збереженню структури деревини.

7. З'ясовано, що просторовий розподіл фенольних сполук у листках рослин має тканинноспецифічну градієнтну структурованість, яка обумовлена бар'єрними функціями і забезпечує захист тканин від фітопатогенів та інших негативних чинників. У разі проникнення вірусів у мезофіл і розвитку вірусної інфекції відбувається просторовий перерозподіл фенольних сполук зі збільшенням їхньої концентрації в мезофілі. За умов розвитку інфекційного процесу з порушенням цілісності тканин системність розподілу фенолів втрачається.







Наукове видання

МЕЛЬНИЧУК МАКСИМ ДМИТРОВИЧ  
ЛІХАНОВ АРТУР ФЕДОРОВИЧ  
КОВАЛЕНКО ТЕТЯНА МЕФОДІЇВНА  
КЛЮВАДЕНКО АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ

Вторинні метаболіти та їх роль у системах адаптації і захисту рослин.

Монографія

Підписано до друку 03.11.2022

Формат 60x84/16. Папір офсетний. Друк цифровий.

Гарнітура Times New Roman

Умовних друкованих аркушів 11,6

Наклад 100 прим. За. № 031122

Видавець ТОВ "Друк"

Реєстраційне свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до

Державного реєстру видавців серія ДК № 5909 від 18.09.2017 р.

Віддруковано з оригіналу макету замовника в ТОВ «Друк»

м. Вінниця, вул. 600-річчя, 25, 21027.