

УДК 60:57.088:634.75:581.1:547.587.1

ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ НА ОРГАНОГЕНЕЗ РОСЛИН СУНИЦІ САДОВОЇ (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) У КУЛЬТУРІ IN VITRO

О.В. СУБІН¹, М.Д. МЕЛЬНИЧУК², А.Ф. ЛІХАНОВ¹, О.Л. КЛЯЧЕНКО¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15

e-mail: subin.oleksandr@gmail.com

²Національна академія аграрних наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 37

Досліджено вплив екзогенної саліцилової кислоти на органогенез суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) у культурі in vitro. Виявлено, що в разі добавляння в поживне середовище 25 мг/л саліцилової кислоти прищвидшувались процеси пагоноутворення, збільшувалась площа листкової поверхні. Методом тонкошарової хроматографії ідентифіковано специфічні сполуки, які синтезуються під впливом саліцилової кислоти і не виявляються в контролі. Встановлено, що під впливом саліцилової кислоти відбуваються зміни вторинного метаболізму, що супроводжуються синтезом біологічно активних сполук із властивостями регуляторів росту.

Ключові слова: *Fragaria ananassa* Duch., суниця садова, саліцилова кислота, органогенез, in vitro.

В ініціації адаптаційних реакцій рослин у відповідь на екзогенні стресові чинники безпосередньо задіяні специфічні органічні сполуки, які виконують функцію регуляторів фізіологічних процесів, а також беруть участь у молекулярному сигналіngu [1]. Однією з таких речовин є саліцилова кислота (СК) — сигнальна молекула фенольної природи, яка в клітинах рослин міститься у вільній, глікозидній та метильованій формах, а також у глюкозоефірах і кон'югатах амінокислот [12]. СК синтезується в клітинах рослин двома незалежними шляхами: фенілпропаноїдним (у цитоплазмі з фенілаланіну) та ізохоризматним (у хлоропластах) [6, 8, 12]. Вона бере участь у процесах дихання, руху проростання насіння, регулює ріст коренів, листків, впливає на швидкість дозрівання плодів. СК — посередник сигнальної трансдукції молекулярних стимулів у відповідь на біотичний та абіотичний стреси [7, 16]. Головними її функціями є регуляція морфогенетичних процесів та внутрішньоклітинний сигналінг рослин [2, 5, 10, 11, 15]. У відповідь на дію патогенів СК стимулює генерування активних форм кисню, накопичення захисних PR-білків (pathogenesis-related proteins), активує ФАЛ (фенілаланінаміакліаза), реакцію надчутливості рослин, бере участь у функціонуванні НАДФН-оксидазної системи [3, 9, 10, 14]. За дії патогенів, еліситорів або екзогенного пероксиду водню концентрація СК збільшується в десятки разів, після чого поступово знижується, що по-

яснюється її виходом із клітини в апопласт, перетворенням на леткий метилсалицилат із подальшою дифузією в повітря, де він бере участь у дистанційному сигналінгу [4].

Суниця садова — доволі складний об'єкт для культури *in vitro*, що пов'язано з її конституціональними ознаками, у тому числі зі здатністю первинних експлантатів до активного синтезу фенольних сполук у відповідь на травматичний стрес. Якісний склад фенольного комплексу і кількість індивідуальних сполук має виражену сортоспецифічність, що створює додаткові проблеми при введенні рослин у культуру *in vitro*. Пригнічення процесів синтезу й окиснення поліфенолів, зниження рівня оксидативного стресу через ретельний добір компонентів поживного середовища є важливою складовою ефективності мікрোকлонального розмноження. З урахуванням адаптогенної і регуляторної ролі СК за стресових умов виправдано очікувати поліпшення загального стану експлантатів на штучних поживних середовищах за умов добавляння до їх складу оптимально підібраних концентрацій екзогенної фенольної кислоти.

Метою роботи було вивчення впливу екзогенної саліцилової кислоти на органогенні процеси суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в культурі *in vitro*.

Методика

Досліджували 5 сортів суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) вітчизняної селекції: Голосіївська рання, Дашенька київська (ранні сорти), Березиня (середньоранній сорт), Факел (пізній сорт) та Аліна клон С4 (сорт нейтрального дня). Отримані асептичні експлантати висаджували на поживне середовище Мурасиге—Скуга, доповнене 0,5 мг/л БАП + +0,75 мг/л ІМК, та на аналогічне середовище з добавлянням 25 мг/л СК.

Для біохімічного аналізу на 21-шу добу культивування відбирали зразки листків рослин-регенерантів та екстрагували 100 %-м метанолом. Морфометричні показники листків (довжину, ширину, площу листової поверхні) визначали за допомогою програмного забезпечення Image Pro Premier 9.0 (США).

Екстракти аналізували на спектрофотометрі Optizen Pop. Якісний склад біохімічних сполук у листках суниці садової визначали методами тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках Sorbfil (Silica gel 60) та вискоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) на пластинках Merck (Silica gel 60) у системі розчинників хлороформ—оцтова кислота—метанол—вода (*v/v* — 60/32/12/8) з подальшою обробкою анісовим альдегідом і наступним нагріванням (5 хв за 105 °С). Індивідуальні сполуки у кількостях, необхідних для подальших досліджень, отримували за допомогою накопичувальної хроматографії. Фізіологічну активність очищених речовин визначали методом біотесту на відрізках колеоптилів пшениці (за Бояркіним).

Результати оброблено статистично за програмою Statistica 6.0.

Результати та обговорення

У результаті досліджень встановлено, що вміст СК в поживному середовищі в концентрації 25 мг/л значно пришвидшує процеси пагоноутворення в експлантатів п'яти сортів суниці (рис. 1). Втім слід зазначити,

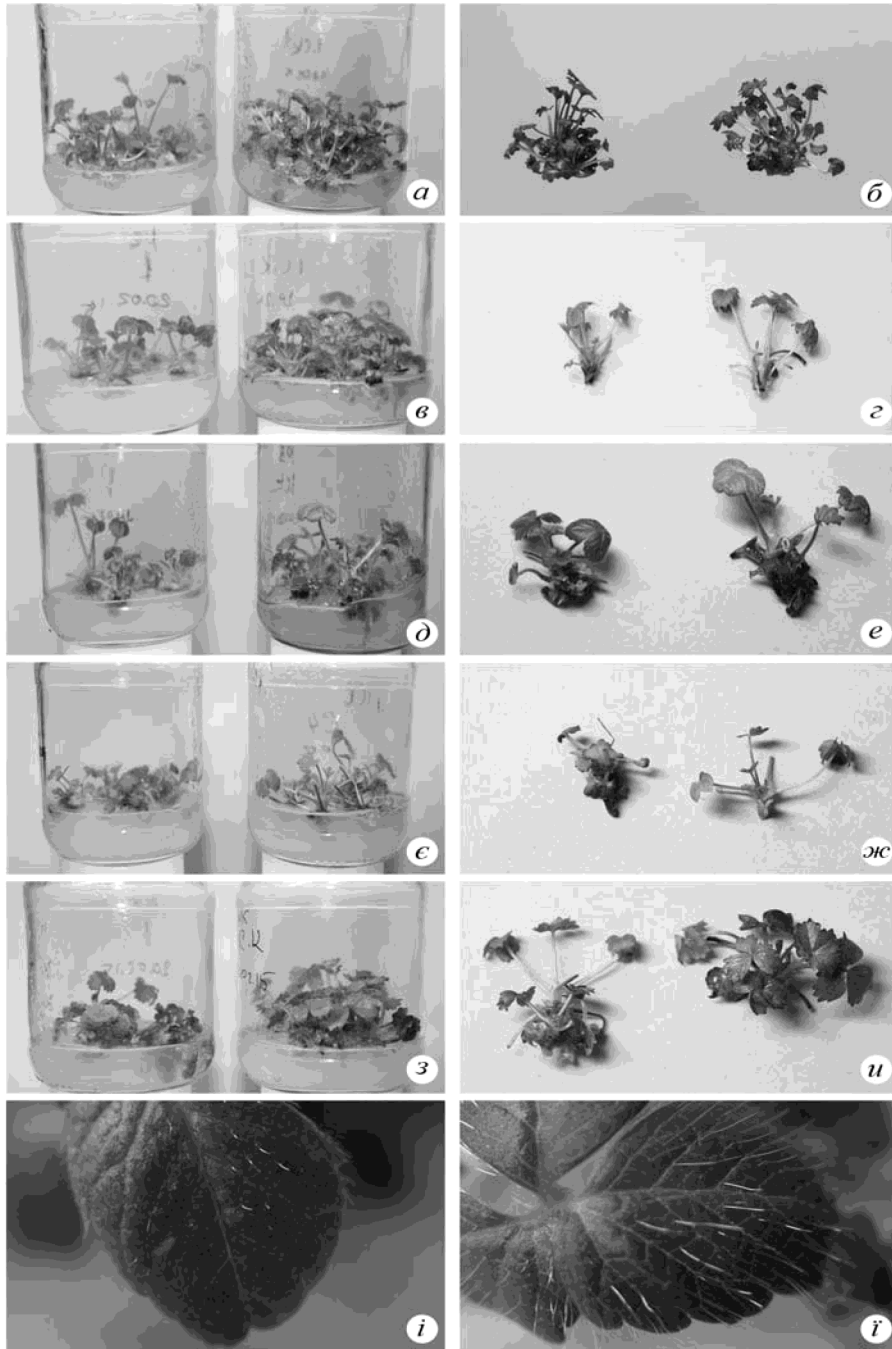


Рис. 1. Сортоспецифічність впливу саліцилової кислоти на органогенез суниці садової в культурі *in vitro*:

a, б – сорт Берегиня; *в, г* – Факел; *д, е* – Голосіївська рання; *є, ж* – Аліна; *з, и* – Дашенька київська; *i* – малоопушена, *i* – густоопушена адаксіальна поверхня листка сорту Голосіївська рання

що біологічний ефект від дії СК на пагони суниці найчіткіше виявлявся у двох із них: Голосіївська рання та Аліна, для яких, порівняно з контролем, було встановлено інтенсивну мультиплікацію пагонів у розетці та істотне збільшення загальної площі листків (рис. 2). Водночас у сор-

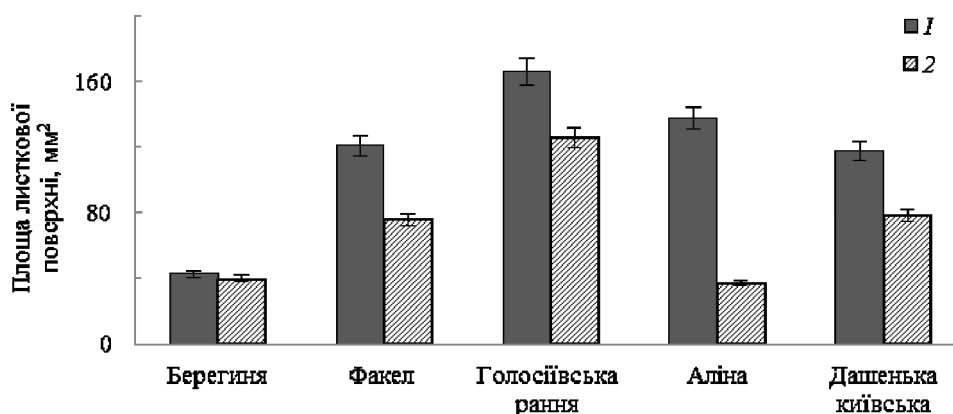


Рис. 2. Вплив саліцилової кислоти на площу листової поверхні суніці садової в культурі *in vitro* (21-ша доба культивування):

1 — саліцилова кислота, 25 мг/л; 2 — контроль

ту Берегиня СК викликала лише індукцію пагоноутворення з формуванням щільних розеток. Крім того, слід зазначити, що сорт Голосіївська рання характеризувався великою кількістю трихом на адаксіальних поверхнях листових пластинок (див. рис. 1, *г*). За добавляння в поживне середовище СК кількість трихом значно зменшувалась або вони майже не утворювались.

За показниками площі листової поверхні міжсортна відмінність виявилась також у межах контрольної групи. Оскільки за цим показником у незахищеному ґрунті між даними сортами істотної відмінності не було, очевидно, що вони перш за все зумовлені режимом культивування і чутливістю рослин до умов *in vitro*.

Інтенсивність ростових процесів рослин-регенерантів у межах досліджуваної групи сортів не залежала також і від загальної кількості фенольних сполук. Так, найбільшу площу листової поверхні в культурі *in vitro* мали рослини сорту Голосіївська рання, в листках якого визначено найвищий вміст фенольних сполук (таблиця). При цьому істотно відрізнялись рослини за площею листків контрольної й досліджуваної груп сорту Аліна, площа яких збільшилась на фоні зменшення загального вмісту фенолів і зокрема флавоноїдів, що індуковано СК. Слід зазначити, що обернену залежність ($r = -0,90$) між площею листової по-

Вплив саліцилової кислоти на вміст фенольних сполук у листках суніці садової *in vitro* (21-ша доба культивування; $M \pm t$; $n = 4$)

Сорт	Флавоноїди, мг/г		Всі фенольні сполуки		Флавоноїди/феноли	
	К	СК	К	СК	К	СК
Берегиня	3,1±0,12	3,0±0,11	34,1±1,36	36,1±1,08	0,09	0,08
Факел	2,6±0,10	2,1±0,06	63,0±2,52	33,3±2,52*	0,04	0,06
Голосіївська рання	3,4±0,14	1,6±0,06*	74,5±3,73	55,9±3,73*	0,05	0,03
Аліна	2,1±0,11	1,5±0,05*	38,6±1,54	15,8±1,54*	0,05	0,09
Дашенька київська	1,6±0,08	2,5±0,10*	48,1±2,41	47,9±2,41	0,03	0,05

Примітка. К — контроль, СК — саліцилова кислота, 25 мг/л.

*Різниця вірогідна порівняно з контролем ($p = 0,05$).

верхні та вмістом флавоноїдів за умов використання СК визначено для всіх досліджуваних сортів.

За відсутності екзогенної СК рівень взаємозв'язків між цими показниками у рослин-регенерантів помітно знижувався ($r = 0,36$). На відміну від рослин, які вирощували на поживних середовищах із додаванням СК, достатньо тісний зв'язок виявлено між площею поверхні листків і загальним вмістом у тканинах фенольних сполук ($r = 0,93$). Цей факт дає підставу припустити, що на формування листків впливає не загальна кількість фенолів, а їх якісний склад. Очевидно також, що СК є індуктором синтезу специфічних сполук, які виконують функції регуляторів росту.

Аналізом якісного складу середньо- і малополярних сполук вторинного метаболізму методом ТШХ у контрольних зразках метанольних екстрактів листків після обробки пластинки анісовим альдегідом виявлено дев'ять сполук. На особливу увагу заслуговує речовина K_2 ($R_f \sim 0,69$), яка утворює темно-буру пляму і виявляється лише в рослин, які вирощували на поживних середовищах без додавання СК. У рослин, регенерація яких відбувалась під впливом екзогенної СК, синтезувалися сполуки, що за положенням на хроматограмі й реакцією на хромогенний реактив виявляли близьку хімічну природу, але мали дещо вищу полярність (SK_2 , $R_f \sim 0,64$). У рослин сорту Березиня ця сполука (ймовірно, дитерпеноїд гіберелінової природи) не синтезувалась або її вміст у листках був незначним і знаходився за межами чутливості методу. Ріст пагонів і показники площі листової поверхні рослин даного сорту в експерименті вірогідно не відрізнялись від контролю. В інших сортів між швидкістю росту листків і наявністю індивідуальної сполуки SK_2 існував прямий зв'язок. Це припущення перевірене на колеоптилях пшениці.

Біологічну активність елюату, який отримували методом накопичувальної хроматографії, визначали за показниками розтягнення клітин колеоптилів. Встановлено, що додавання до 2 %-го розчину сахарози виділеної й очищеної речовини стимулювало розтягування клітин і приводило до збільшення довжини відрізків колеоптилів. Стимулювальна дія SK_2 була порівнюваною з дією гіберелової кислоти (ГБ). У разі додавання до розчину сахарози одночасно SK_2 і ГБ (10 мкг/мл) ростові процеси гальмувались. Аналогічний результат отримано за сумісної дії на колеоптилі K_2 і ГБ (рис. 3).

Виражену гальмівну дію чинила також неполярна сполука SK_3 ($R_f \sim 0,89$), яку було виявлено у 100 %-х метанольних екстрактах досліджених сортів суніці. За додавання її до 2 %-го розчину сахарози інтенсивність розтягування колеоптилів знижувалась майже вдвічі порівняно з контролем (див. рис. 3). Це означає, що під впливом СК значно перебудовується вторинний метаболізм, що супроводжується синтезом біологічно активних сполук із властивостями регуляторів росту.

Крім того, встановлено, що додавання СК до базових поживних середовищ стимулює синтез хлорогенової кислоти (5-кофеїлхінна кислота, 5-QCA), її ізомерів та інших кон'югатів оксикоричних кислот (рис. 4). Всього методом ВЕТШХ виявлено 6 індивідуальних сполук з яскравою блакитною автофлуоресценцією, індукованою УФ-світлом (365 нм).

Фотоденситометричний аналізом хроматограми було з'ясовано, що за співвідношенням концентрації фенольних сполук найтісніший зв'язок (коефіцієнт кореляції $r = 0,88$) існує між вмістом речовини, яку за іден-

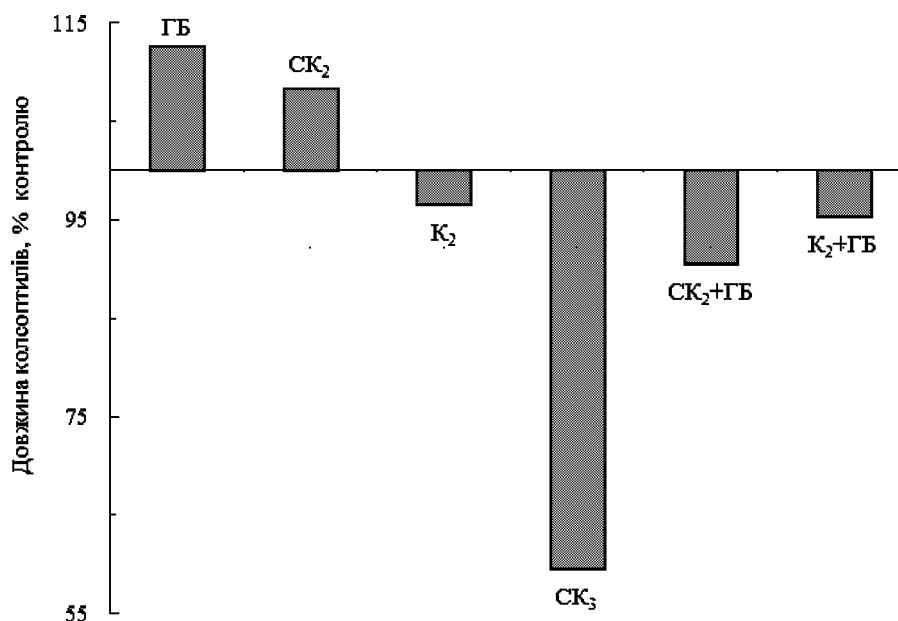


Рис. 3. Порівняльний вплив біологічно активних сполук на процеси розтягування клітин колеоптилів пшениці:

ГБ — гіберелін; СК₂ ($R_f \sim 0,64$) і К₂ ($R_f \sim 0,69$) — речовини, які виділені з листків суниці садової сорту Аліна за умов вирощування рослин на поживному середовищі з додаванням і без додавання саліцилової кислоти відповідно; СК₃ ($R_f \sim 0,89$) — речовина, що синтезується в листках суниці сорту Аліна під впливом саліцилової кислоти

тичним положенням на хроматограмі специфічного стандарту, характером флуоресценції і реакцією на хромогенні реактиви можна визначити як хлорогенову кислоту (5-QCA, $R_f \sim 0,53$), та іншим кон'югатом оксикоричної кислоти ($R_f \sim 0,61$). Рівень накопичення останньої сполуки також вірогідно пов'язаний з площею листової поверхні ($r = 0,78$). Індуковане підвищення її вмісту в тканинах листків мало сортові відмінності

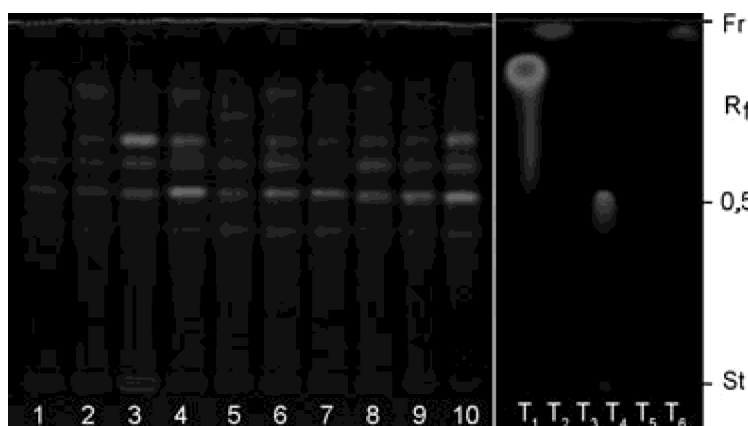


Рис. 4. Автофлуоресценція оксикоричних кислот рослин-регенерантів суниці садової на хроматограмі:

1, 2 — сорт Берегиня; 3, 4 — Факел; 5, 6 — Голосіївська рання; 7, 8 — Аліна; 9, 10 — Дашенька київська; 1, 3, 5, 7, 9 — рослини, вирощені на поживному середовищі, без додавання саліцилової кислоти; 2, 4, 6, 8, 10 — з додаванням саліцилової кислоти; T₁— T₆ — стандарти кислот (T₁ — кавова, T₂ — ферулова, T₃, T₄ — хлорогенова (5-QCA), T₅ — *p*-кумарова, T₆ — ванілінова); St — лінія старту; Fr — лінія фронту; R_f — співвідношення відстані, яку пройшла речовина, до відстані, яку пройшов розчинник

й коливалося в межах 1,1—3,7 раза. За рівнем індукованого підвищення вмісту цієї сполуки в порядку зростання сприйнятливості рослин досліджені сорти розмістились у ряд Берегиня (1,07 раза) < Факел (1,57) < Дашенька київська (1,21) < Голосіївська рання (1,64) < Аліна (2,28).

Збільшення вмісту 5-QCA та інших похідних коричних і оксикоричних кислот, похідних флороглюцину і фенілетанолу в тканинах листків суниці садової під впливом екзогенної СК є результатом індукованої перебудови фенілпропанної синтезу, який істотно впливає на фізіологічний стан рослин, пришвидшує процеси органогенезу в регенерантів за умов *in vitro*, що є критичним показником ефективності мікроклонального розмноження рослин. На тлі зменшення загальної кількості фенолів у листках (у тому числі флавоноїдів) підвищення вмісту кон'югатів оксикоричних кислот створює передумови для пробудження апікальних і пазушних бруньок, а також стимулює закладання адвентивних бруньок, унаслідок чого збільшується загальна кількість пагонів у розетках.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що добавлення в поживне середовище 25 мг/л СК значно пришвидшує процеси пагоноутворення. Порівняно з контролем у сортів Голосіївська рання та Аліна виявлялась інтенсивна мультиплікація пагонів у розетці, вірогідно збільшувалась загальна площа листків. За використання екзогенної СК залежність між площею листків і вмістом флавоноїдів була оберненою ($r = -0,90$). Під впливом СК перебудовується вторинний метаболізм, що супроводжується синтезом біологічно активних сполук, у тому числі терпеноїдів і кон'югатів оксикоричних кислот із властивостями регуляторів росту.

1. *Вольнец А.П.* Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. — Минск: Беларусь. наука, 2013. — 283 с.
2. *Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О.* Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов // Физиология и биохимия культ. растений. — 2013. — 45, № 2. — С. 113—125.
3. *Молодченкова О.О.* Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях // Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — 33, № 6. — С. 463—474.
4. *Плотникова Л.Я., Штубей Т.Ю.* Влияние салициловой и янтарной кислот на фитобиологические реакции пшеницы, инфицированной бурой ржавчиной // Цитология. — 2009. — 51, № 1. — С. 41—50.
5. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений / Отв. ред. А.Н. Гречкин. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
6. *Abdul Rashid War, Michael Gabriel Paulraj, Mohd Yousf War, Savarimuthu Ignacimuthu.* Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Signal. Behav. — 2011. — N 6:11. — P. 1787—1792.
7. *Alfonso Larque-Saavedra, Rodolfo Martin-Mex.* Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants // Salicylic Acid — a Plant Hormone / Eds S. Hayat, A. Ahmad. — Berlin: Springer-Verlag, 2007. — P. 15—24.
8. *Chen Z., Zheng Z., Huang J. et al.* Biosynthesis of salicylic acid in plants // Plant Signal. Behav. — 2009. — N 4. — P. 493—496.
9. *Chuanfu An, Zhonglin Mou.* Salicylic acid and its function in plant immunity // J. Integr. Plant Biol. — 2011. — N 53 (6). — P. 412—428.
10. *Durner J., Shah J., Klessig D.F.* Salicylic acid and disease resistance in plants // Trends Plant Sci. — 1997. — N 2. — P. 266—274.
11. *Ghaderi N., Hormohammadi S., Javadi T.* Morpho-physiological responses of strawberry (*Fragaria ananassa*) to exogenous salicylic acid application under drought stress // J. Agr. Sci. Technol. — 2015. — 17. — P. 167—178.
12. *Klessig D.F., Malamy J.* The salicylic acid signal in plants // Plant Mol. Biol. — 1994. — N 26. — P. 1439—1458.

13. Lee H., Leon J., Raskin I. Biosynthesis and metalolism of salicylic acid // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — N 92. — P. 4076—4079.
14. Mariana Rivas-San Vicente, Javier Plasencia. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development // J. Exp. Bot. — 2011. — 62, N 10. — P. 3321—3338.
15. Metraux J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge // Eur. J. Plant Pathol. — 2001. — N 107. — P. 13—18.
16. Morris K., Mackerness S.A.H., Page T. et al. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence // Plant J. — 2000. — N 23. — P. 677—685.

Отримано 11.11.2015

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОРГАНОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ
ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.В. Субин¹, М.Д. Мельничук², А.Ф. Лиханов¹, О.Л. Кляченко¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

²Национальная академия аграрных наук Украины, Киев

Исследовано влияние экзогенной салициловой кислоты на органогенез земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) в культуре in vitro. Обнаружено, что при добавлении в питательную среду 25 мг/л салициловой кислоты ускорялись процессы побегообразования, увеличивалась площадь листовой поверхности. Методом тонкослойной хроматографии идентифицированы специфические соединения, которые синтезируются под влиянием салициловой кислоты и не обнаруживаются в контроле. Установлено, что под влиянием салициловой кислоты происходят изменения вторичного метаболизма, которые сопровождаются синтезом биологически активных соединений со свойствами регуляторов роста.

INFLUENCE OF SALICYLIC ACID ON ORGANOGENESIS OF IN VITRO PLANTS
FRAGARIA ANANASSA DUCH.

O.V. Subin¹, M.D. Melnychuk², A.F. Likhanov¹, O.L. Klyachenko¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

13 Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine

²National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

37 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Influence of salicylic acid on organogenesis of in vitro plants *Fragaria ananassa* Duch. have been investigated. Addition of salicylic acid to the nutrient medium at the concentration of 25 mg/l accelerates shoot formation and increases the area of lamina. TLC method has shown specific compounds which synthesized under the influence of salicylic acid and do not occurred in the control. It was demonstrated that under the influence of salicylic acid occur changes of secondary metabolism, which are accompanied by the synthesis of biologically active compounds with the properties of growth regulators.

Key words: *Fragaria ananassa* Duch., salicylic acid, organogenesis, in vitro.