

УДК 633:57.085.2:634.8.074

## ВПЛИВ ОКСИКОРИЧНИХ І ОКСИБЕНЗОЙНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПЛАСТИДНИХ ПІГМЕНТІВ І ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ЛИСТКАХ ВИНОГРАДУ (*VITIS VINIFERA*) IN VITRO

А.Ф. ЛІХАНОВ<sup>1</sup>, О.В. СЕРЕДА<sup>2</sup>, О.Л. КЛЯЧЕНКО<sup>3</sup>, М.Д. МЕЛЬНИЧУК<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Інститут еволюційної екології Національної академії наук України  
03143 Київ, вул. Акад. Лебедева, 43  
e-mail: likhanov.bio@gmail.com

<sup>2</sup>Китайсько-Український Інститут Наук про Життя  
Чжудзі, пров. Чжуцзян, вул. Південна Веньчжун, 26  
e-mail: tritavki@ukr.net

<sup>3</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України  
03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15  
e-mail: klyachenko@ukr.net

<sup>4</sup>Агрономіка LTD  
08130 с. Чайка, Києво-Святошинський р-н, Київська обл.,  
вул. Лобановського, 28  
e-mail: melnychuk.maks@gmail.com

Встановлено, що сирінгова, ванілінова, кавова і ферулова кислоти в концентрації 1 мкМ у складі поживного середовища Мурасиге—Скуга стимулюють накопичення пластидних пігментів у листках винограду *in vitro*. Найсильніший біологічний ефект за вмістом хлорофілу *a* чинила ферулова (4-гідрокси-3-метоксибензойна) кислота, в структурі якої міститься метоксигрупа. Заміщення однієї оксигрупи на метоксигрупу в оксикоричних кислотах істотно підвищувало їх стимуловальну дію. В культурі *in vitro* вміст каротиноїдів у листках винограду зростав в 1,8 раза за умов додавання до поживного середовища ванілінової кислоти. Сумісна дія фенольних кислот на кількісні показники пігментів фотосинтетичного апарату чинила менш виражений, скомпенсований ефект. З'ясовано, що ферулова кислота, яка надходить у тканини мікропагонів винограду безпосередньо з поживного середовища, підвищує в листках вміст стильбеноїдів, зокрема ресвератролу й піцеїду, які мають високий антиоксидантний потенціал і виконують функцію фітоалексинів.

**Ключові слова:** виноград, оксикоричні кислоти, оксисбензойні кислоти, пігменти, фенольні сполуки, ресвератрол.

Переважаюча більшість фенольних сполук у рослинах утворюється шикиматним шляхом і знаходиться у вільній, кон'югованій та зв'язаній формах [3]. Синтез фенольних сполук і їх кількісне співвідношення є збалансованим елементом динамічної системи регуляції гомеостазу [2]. За підвищення чи зниження концентрації одного з фенольних компонентів, що відбувається у клітинах під дією внутрішніх або зовнішніх чинників, рослинний організм активує ферментні системи,

включені до метаболічних ланцюгів компенсаторних реакцій. У рослинному організмі кількість фенольних кислот співвідноситься з концентраціями фітогормонів. Оскільки фенольні сполуки впливають на гормональну регуляцію морфогенезу [10, 16], виконують широкий спектр регуляторних і захисних функцій [3, 15], для розуміння ролі окремих оксикоричних і оксибензойних кислот вельми цікавим є моделювання умов їх підвищеного вмісту в рослинних тканинах.

Метою наших досліджень було вивчення впливу ванілінової, сирінгової, кавової і ферулової кислот на якісний і кількісний склад пластидних пігментів і фенольних сполук у листках рослин-регенерантів винограду *in vitro*.

### Методика

Досліджували рослинний матеріал винограду сорту Геркулес. На етапі розмноження рослин до поживного середовища (ПС) за прописом Мурасиге і Скуга (МС) [23] добавляли БАП у концентрації 0,5–2,5 мг/л, кінетин 0,5–2,5 мг/л та тидіазурон (ТДЗ) 0,5–2,5 мг/л. Мікропагони укорінювали за допомогою 0,5–2,5 мг/л ІМК та 0,5–2,5 мг/л ІОК. Для визначення фізіологічного впливу фенольних сполук на процеси розвитку рослин-регенерантів винограду до ПС добавляли ванілінову, сирінгову, кавову і ферулову кислоти в кількості 1 мкМ (рис. 1). Експлантати культивували в культуральній кімнаті протягом 3 тижнів за температури 25 °С, вологості повітря 70–75 %, 16-годинного фотоперіоду та інтенсивності освітлення 3,5–4,0 клк.

Вміст хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів у листках рослин-регенерантів визначали в метанольних екстрактах, які отримували у співвідношенні 1 : 10 (наважка листків : метанол). Кількісний вміст хлорофілів ( $C_a$ ,  $C_b$ ) та каротиноїдів ( $C_{x+c}$ ) в екстрактах визначали за допомогою сканувального спектрофотометра Optizen Pop (Південна Корея) й обчислювали за формулами

$$C_a = 16,72 A_{665,2} - 9,16 A_{652,4} \text{ (мг/мл);}$$

$$C_b = 34,09 A_{652,4} - 15,28 A_{665,2} \text{ (мг/мл);}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{700} - 1,63 C_a - 104,96 C_b) / 221 \text{ (мг/мл) [31].}$$

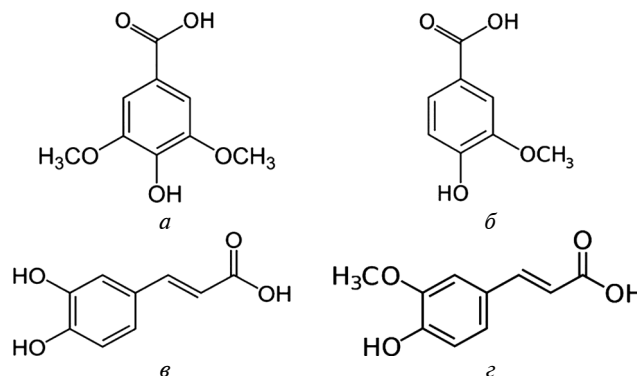


Рис. 1. Оксибензойні (*a*, *b*) та оксикоричні (*в*, *г*) кислоти:

*a* — сирінгова (4-гідрокси-3,5-диметоксибензойна); *b* — ванілінова (4-гідрокси-3-метоксибензойна); *в* — кавова (3,4-діоксикорична); *г* — ферулова (3-метокси-4-гідроксикорична) [31]

Загальний вміст фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом (СФ Optizen Pop, Південна Корея) з використанням реактиву Фоліна—Чекольтеу [5]. Калібрувальний графік будували за гисловою кислотою (Merck, Німеччина).

Кількісний вміст флавоноїдів у листках визначали за  $\lambda = 419$  нм. До 300 мкл екстракту послідовно добавляли 200 мкл 0,1 М розчину хлориду алюмінію ( $AlCl_3$ ) і 300 мкл 1 М ацетату натрію ( $CH_3COONa$ ). Калібрувальний графік будували за кверцетином (Sigma, Німеччина).

Вміст катехинів установлювали за реакцією на ваніліновий реактив. Для цього до 100 мкл екстракту поступово добавляли 900 мкл метанолу, 2,5 мл 1 %-го розчину ваніліну та 2,5 мл 9 н розчину  $H_2SO_4$  в метанолі. Оптичну густину ( $D$ ) реакційної суміші визначали через 30 хв за  $\lambda = 500$  нм [28]. Повторність біохімічних аналізів п'ятиразова.

Концентрацію фенольних антиоксидантів у екстрактах знаходили спектрофотометрично за Бренд—Вільямсом із застосуванням вільного стабільного радикала 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (ДФПГ) [9]. Для побудови калібрувального графіка як стандарт використовували водорозчинний вітамін Е (Тролокс). Щоб отримати вихідний розчин, 6 мг вітаміну Е ( $M_{Тролокс} = 250,29$ ) розчиняли у 2,4 мл 80 %-го етанолу. Реакційна суміш містила 0,25 мл рослинного екстракту, 1,75 мл 80 %-го етанолу та 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ ( $M_{ДФПГ} = 394,33$ ). У контрольні зразки до 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ добавляли по 2 мл 80 %-го етанолу. Реакція розпочиналася після добавлення розчину ДФПГ. Пробірки інтенсивно струшували і залишали на 30 хв у темряві за кімнатної температури. Оптичну густину реакційної суміші визначали за довжини хвилі 517 нм. Ступінь інгібування ДФПГ ( $I_{ДФПГ}$ ) у відсотках розраховували за формулою

$$I_{ДФПГ} = (D_k - D_d) / D_k \cdot 100 \%,$$

де  $D_k$  — оптична густина за відсутності антиоксидантів (контроль);  $D_d$  — оптична густина за наявності антиоксидантів (для калібрувальної кривої — Тролокс у відомих концентраціях).

Антиоксидантну активність рослинних екстрактів виражали в мкМ-екв Тролокс [5].

Якісний аналіз малополярних речовин, пігментів і фенольних сполук у метанольних екстрактах проводили методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) на пластинках Silicagel G60 (Merck, Німеччина) у системі розчинників: хлороформ—оцтова кислота—метанол—вода ( $v/v/v/v = 60/32/12/8$ ) [4]. Індивідуальні продукти на хроматограмі виявляли в УФ-світлі ( $\lambda_{max} = 365$  нм) та аналізували за допомогою програми Sorbfil TLC Videodensitometer.

Речовини розділяли за допомогою обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у системі Agilent 1260, що оснащена 4-канальним насосом, вакуумним дегазатором, автосамплером, термостатом колонок та діодно-матричним детектором. Безпосередньо перед аналізом зразки фільтрували крізь шприцевий фільтр 0,2—0,5 мкм. Використовували двохелюентну схему (елюент I — 5 г/л водний розчин ортофосфорної кислоти; елюент II — ацетонітрил) на

колонці Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>, 5 мкм, 4,6×250 мм. Об'єм зразка 5 мкл, термостатування колонки 20 °С, швидкість потоку 1,0 мл/хв; тривалість аналізу 35 хв, профіль елюювання — ізократично 15 % елюент II в елюенті I протягом 5 хв, далі — лінійний градієнт від 15 до 35 % II в I за 20 хв, наприкінці ізократа 35 % II в I протягом 7 хв і більше. Базове детектування проводили за довжини хвиль 205 і 254 нм, додаткові довжини хвиль обирали за потреби (300 і 325 нм — для оксикоричних кислот, 350 нм — для флавоноїдів).

Обробляли й візуалізували хроматографічні дані (в тому числі й спектри поглинання) за допомогою програмного забезпечення Agilent Chem Station і Corel Draw X3.

Експериментальні дані оброблено статистично з використанням пакета програм «Аналіз електронних таблиць Microsoft Excel» і Statistica 7.0. Вірогідність відмінностей кількісних показників визначено за найменшою істотною різницею (НІР) за  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Біологічна активність фенольних сполук значною мірою зумовлена наявністю і положенням замісників (окси- й метоксигруп) у бензольному ядрі. В результаті дослідження впливу оксибензойних та оксикоричних кислот на синтез і накопичення пластидних пігментів (хлорофілів, каротиноїдів) у листках винограду встановлено, що фенольні кислоти за їх добавляння до поживного середовища МС активні навіть у мікромольних концентраціях (табл. 1). За добавляння до ПС ферулової кислоти, яка містить одну метоксигрупу (див. рис. 1), спостерігали стимулювання синтезу хлорофілу *a*, кількість якого порівняно з контролем збільшувалась в 11,2 раза, тоді як сума хлорофілів — у 7,8 раза. Проте в експериментах, які ми проводили з іншими ягідними культурами *in vitro* (малина, чорна смородина), ферулова кислота, навпаки, викликала незначне зменшення в листках кількості хлорофілів (неопубліковані дані). Менш виражений стимулювальний ефект зафіксовано за додавання до ПС кавової кислоти, в структурі якої було дві оксигрупи. Отже, заміщення однієї оксигрупи на метоксигрупу в оксикоричних кислот потенційно підвищує їх стимулювальну дію. Цей факт підтвердив дані щодо поліпшення показників енергії проростання і схожості насіння за умов використання як стимуляторів фенольних кислот з однією метоксигрупою [2].

Бензойні кислоти сприяли незначному збільшенню кількості хлорофілів, а комплекс оксикоричних і оксибензойних кислот активніше впливав на накопичення зелених пігментів, ніж окремо ванілінова, сирінгова і кавова кислоти, та сприяв збільшенню у листках частки хлорофілу *b*, що відповідно призводило до зменшення співвідношення хлорофіл *a*/хлорофіл *b* (див. табл. 1).

Найвищий вміст каротиноїдів у листках винограду визначено за умов додавання до ПС ванілінової кислоти (містить окси- і метоксигрупи). В культурі *in vitro* цей показник порівняно з контролем зростав в 1,8 раза.

У контрольному варіанті й рослин, які культивували на ПС із фенольними кислотами, максимума поглинання у синій і фіолетовій

ВЛИЯНИЕ ОКСИКОРИЧНЫХ И ОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив оксикоричних і оксисбензойних кислот на вміст і співвідношення пластидних пігментів у листках винограду *in vitro* ( $M \pm m$ ;  $n = 4$ )

Кислота	Хлорофіл, мг/г				Кр, мг/мл	$\frac{\text{Хл. } a+b}{\text{Кр}}$
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>	<i>a/b</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	<b>1,11±0,06</b>	0,63
Фе	<b>1,90±0,06</b>	0,29±0,02	<b>2,19±0,09</b>	<b>6,52</b>	0,91±0,04	<b>2,42</b>
Кв	0,62±0,03	<b>0,37±0,02</b>	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	<b>2,09</b>	0,94±0,05	0,69
Су	<b>0,74±0,04</b>	<b>0,55±0,03</b>	<b>1,29±0,02</b>	1,35	<b>1,07±0,06</b>	<b>1,21</b>
НІР <sub>0,05</sub>	0,04	0,02	0,06	0,12	0,05	0,05

Примітка: Кр — каротиноїди; К — контроль; Вн — ванілінова; Фе — ферулова; Кв — кавова; Сн — сирінгова; Су — сума всіх кислот. Темним шрифтом виділено найбільший вміст пігментів.

частинах спектра були за довжин хвиль 470, 445, 418 нм (рис. 2), що зазвичай пов'язано з накопиченням у листках значної кількості ксантофілів [6], зокрема віолаксантину [11]. За його наявності фотохімічні комплекси хлоропластів оптимізовані для передавання енергії світла на хлорофіли [25], що важливо для рослин, які ростуть в умовах затінення і штучного освітлення. Отже, що стосується якісного складу фотосинтетичного апарату, ванілінова, кавова, сирінгова, а також комплекс кислот чинять доволі сприятливу дію.

Специфічний вплив на якісний склад каротиноїдів у листках рослин-регенерантів винограду показано за умов добавляння до ПС ферулової кислоти. На спектрограмах спиртових екстрактів рослин, які культивували з екзогенною феруловою кислотою, спостерігали

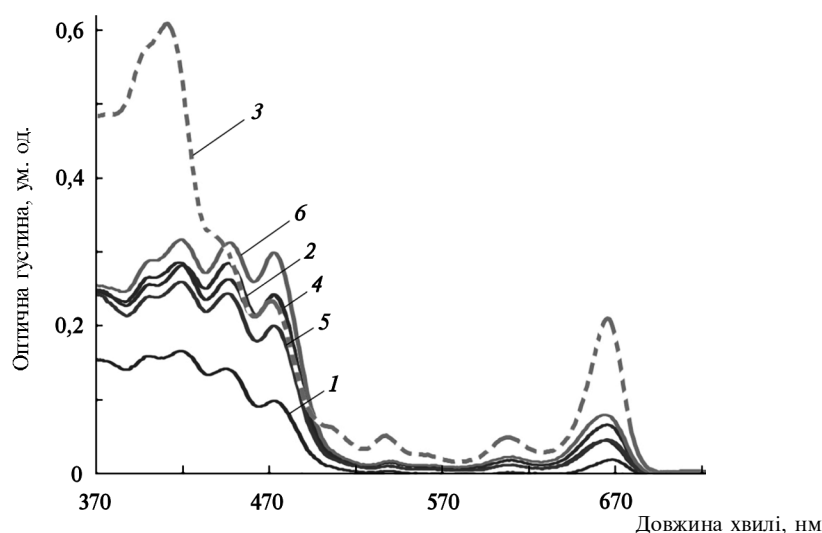


Рис. 2. Спектри поглинання екстрактів листків винограду за умов культивування рослин на поживних середовищах із фенольними кислотами (конц. 1 мкМ) *in vitro*:

1 — контроль; 2 — ванілінова; 3 — ферулова; 4 — кавова; 5 — сирінгова; 6 — сума всіх кислот

посилення абсорбційної здатності світла в синій ( $\lambda_{\max} = 413$  нм), зеленій ( $\lambda_{\max} = 537$  нм) та оранжевій частинах спектра ( $\lambda_{\max} = 607$  нм) (див. рис. 2). Відмінності цих показників можуть бути пов'язані з накопиченням у листках неоксантину, який утворюється в результаті деепоксидації віолаксантину [8]. Неоксантин є попередником абсцизової кислоти [24], тому його накопичення в асиміляційних тканинах забезпечує потенційну стійкість рослин до стресу. Загалом характер дії окремих фенольних кислот на пігментний комплекс листків винограду сорту Геркулес є доволі специфічним, однак цей ефект нівелюється в разі поєднання кислот у комплекс.

У хлоропластах крім фотосинтезу відбуваються синтез і біохімічна трансформація фенольних сполук [3]. Кон'югати фенолів у формі глікозидів, фенольних ефірів є більш рухливими і здатними для активного транспорту [2]. Усі досліджені нами кислоти за умов їх додавання до ПС сприяли накопиченню в листках фенольних сполук, зокрема флавоноїдів і катехінів (табл. 2).

Кавова кислота спричиняла накопичення в листках винограду катехінів, ферулова — стимулювала збільшення вмісту загальних фенольних сполук, флавоноїдів та фенольних антиоксидантів. Екзогенні фенольні кислоти у комплексі уповільнювали накопичення в листках фенолів (переважно групи катехінів) і зменшували їх загальний антиоксидантний потенціал.

У результаті аналізу якісного складу вторинних метаболітів у контрольних зразках і в листках винограду на ПС, що містило ферулову кислоту, методом ВЕРХ було ідентифіковано катехін, епікатехін, сирінгову і ферулову кислоти та інші фенольні сполуки (рис. 3).

У прикладному аспекті на особливу увагу заслуговує ефект, що спостерігався в культурі винограду *in vitro* під впливом ферулової й сирінгової кислот, до складу яких входять відповідно одна і дві метоксигрупи (див. рис. 1). Дослідженням екстрактів методом ВЕТШХ у листках виявлено високий вміст речовин із коефіцієнтом рухливості

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив оксикоричних і оксибензойних кислот на вміст і співвідношення фенольних сполук у листках винограду *in vitro* ( $M \pm m$ ;  $n = 4$ )

Кислота	Феноли, мг/г	Флавоноїди, мг/г	Відношення феноли / флавоноїди	Катехіни, мг/г	Антиоксидантна активність, мкМ-екв
К	17,3±0,09	1,1±0,02	15,2	5,9±0,01	5,1±0,05
Вн	30,7±0,15	1,6±0,02	<b>19,7</b>	<b>11,3±0,06</b>	<b>14,8±0,07</b>
Фе	<b>35,6±0,18</b>	<b>2,7±0,05</b>	13,3	6,2±0,04	8,8±0,04
Кв	<b>35,6±0,16</b>	1,5±0,03	<b>23,9</b>	<b>13,4±0,07</b>	<b>10,1±0,05</b>
Сн	21,8±0,10	1,3±0,02	17,3	8,0±0,05	9,4±0,05
Су	22,7±0,11	1,5±0,04	14,8	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; Вн — ванілінова; Фе — ферулова; Кв — кавова; Сн — сирінгова; Су — сума всіх кислот. Темним шрифтом виділено найбільший вміст фенольних сполук.

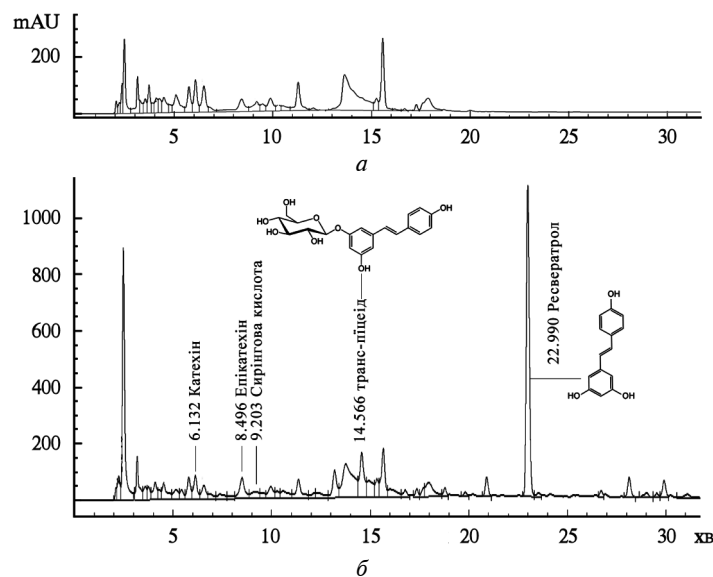


Рис. 3. Хроматограма метанольних екстрактів листків винограду за культивування рослин *in vitro* на базовому поживному середовищі (а) й на поживному середовищі з феруловою кислотою (б); детектування за 205 нм

$R_f \sim 0,50$  і  $R_f \sim 0,75$  (рис. 4). При цьому вміст ферулової кислоти в листках рослин-регенерантів на модифікованому ПС був нижчим за контрольні значення. Це може свідчити про здатність екзогенної кислоти або її можливих кон'югатів впливати на синтез і накопичення у компартментах клітин ферулової кислоти в процесі метаболізму. У досліджених зразках підтверджено також підвищений вміст стильбеноїдів (табл. 3). У результаті аналізу хроматографічних піків встановлено, що речовини з часом утримання 22,9 і 14,5 хв мають УФ-спектри, характерні для ресвератролу та його глікозиду — піцеїду. Попередником стильбеноїдів є *n*-кумарова кислота, з якої внаслідок синтезу кавової утворюється також ферулова кислота. Ресвератрол синтезується за участю стильбенсинтази (СТС) (КФ 2.3.1.95), яка за структурою і функціями подібна до халконсинтази (ХСТ) (КФ 2.3.1.74) — ключового ензиму в синтезі флавоноїдів [3, 29].

Ресвератрол надзвичайно активний поліфенольний антиоксидант [1, 20], який утворюється у тканинах винограду та інших видів рослин в умовах стресу [12]. Метаболіт виконує роль фітоалексину [7, 19, 21] у відповідь на дію фітопатогенних грибів і мікроорганізмів [14]. Ресвератрол, *транс*-ресвератрол, *транс/цис*-піцеїд, -вініферин, птеростильбен можуть синтезуватись у суспензійній культурі клітин винограду під впливом метилжасмонату, саліцилової кислоти і хітозану [26, 30] — відомих індукторів захисних реакцій рослин.

Саліцилатні й жасмонатні сигнальні шляхи досліджені достатньо, проте питання впливу ферулової і сирінгової кислот на активування ферментних систем синтезу фітоалексинів стильбеноїдної природи в листках винограду залишається не вивченим. Ферулова кислота при транслокації по ксилемі мікропагонів рослин досить швидко потрапляє в листки. Далі від термінальних трахеїд розгалужу-

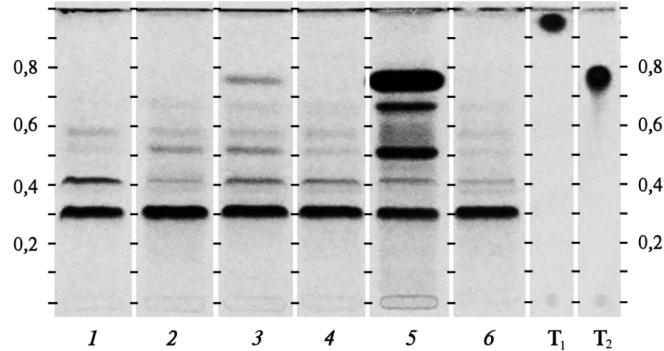


Рис. 4. Хроматограма метанольних екстрактів листків винограду в культурі *in vitro* на поживному середовищі з додаванням фенольних кислот (конц. 1 мкМ):

1 — контроль; 2 — сума всіх кислот; 3 — сирінгова; 4 — кавова; 5 — ферулова; 6 — ванілінова; стандарти T<sub>1</sub> — ферулова кислота; T<sub>2</sub> — кавова кислота; сорбент Silicagel G60; система розчинників хлороформ—оцтова кислота—метанол—вода (v/v/v/v — 60/32/12/8); візуалізація в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм; інвертоване зображення

ної сітки жилок листків вона здатна проникати в міжклітинники мезофілу. Слід враховувати, що за умов надходження екзогенної ферулової кислоти з ПС до транспортної системи стебла і листків, вона може піддаватись етерифікації та іншим способам біохімічної трансформації [22], а фізіологічна відповідь рослин — істотно вирізняється. Так, пероксидаза (КФ 1.11.1.7) перетворює ферулову кислоту на диферуловий поліфенол, який входить до складу клітинних стінок рослин [13, 15]. Вважають, що ефір фенольної кислоти зв'язується з пектинами клітинних стінок [22] і є центром приєднання до них молекул лігніну [3]. Ферулова кислота також здатна утворювати ефірні зв'язки з арабіноксиланами [27]. Кон'югати або незв'язані диферулові сполуки можуть виходити у міжклітинний простір під час ферментативного гідролізу біополімерів (целюлози й геміцелюлози) фітодеструкторами, а підвищення активності СТС можливе за наявності в матриксі клітинних стінок винограду відповідних сенсорних систем, функція яких полягає в трансдукції хімічного сигналу за умов проникнення фітопатогенних грибів у тканини рослини. За участю грибних лаказ (КФ 1.10.3.2) біохімічній трансформації піддаються й бензойні кислоти [29]. Під дією ензиму сирінгова і ванілінова кислоти полімеризуються або перетворюються на метоксибензохінони [18], які виявляють бактерицидну активність і можуть виконувати функцію індукованого захисту рослинного організму.

Є також підстави вважати, що реакція рослин на екзогенні фенольні кислоти залежить від способу їх надходження в рослинні тканини. Ми довели, що одноразова обробка поверхні листків винограду *in vivo* 1 мкМ розчином ферулової кислоти протягом 24 год помітно не активує синтез ресвератролу в рослин. За таких умов проникненню ферулової кислоти в тканини листків заважають зовнішні кутикулярні бар'єри, які уповільнюють відповідні фізіологічні реакції рослин.

Важливе значення має також локалізація фенольних сполук у клітинних компартментах, оскільки ендogenous сирінгова і ферулова



ВЛИЯНИЕ ОКСИКОРИЧНЫХ И ОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

ТАБЛИЦЯ 3. Якісний склад фенольних сполук у листках винограду, що отримані методами вискоєфективної тонкошарової і рідинної хроматографії

ВЕТШХ ( $R_f$ )	ВЕРХ ( $t_{RT}$ , хв)	УФ-спектр	Примітка
0,30	5,8		Ізомер або кон'югат хлорогенової кислоти
0,41	10,34		Цинамоїльно-подібний УФ-спектр
0,50	14,57		УФ-спектр відповідає <i>транс</i> -цінієду
0,75	22,9		УФ-спектр відповідає ресвератролу

кислоти, які були виявлені у тканинах листків винограду, на синтез ресвератролу активно не впливали.

Отже, оксисбензойні (сирінгова, ванілінова) та оксикоричні (кавова, ферулова) кислоти у складі поживного середовища МС в концентрації 1 мкМ сприяють накопиченню в листках винограду *in vitro* пластидних пігментів. Найбільш виражений стимулювальний ефект за вмістом хлорофілу *a* чинила ферулова кислота, в молекулі якої є

одна метоксигрупа. Збільшення вмісту каротиноїдів у 1,8 раза в листках винограду в культурі *in vitro* визначено за умов додавання ванілінової кислоти. З'ясовано, що заміщення однієї оксигрупи на метоксигрупу в оксикоричних кислот значно підвищує їх стимулювальну дію. Ферулова кислота за безпосереднього надходження з поживного середовища у тканини мікропагонів активує в листках синтез стильбеноїдів, зокрема ресвератролу й *транс*-піцеїду, які виконують функцію фітоалексинів з вираженими антиоксидантними властивостями.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Фенольные соединения виноградной лозы: структура, антиоксидантная активность, применение. *Біотехнологія*. 2009. **2**, № 2. С. 67–75.
2. Вольнец А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларус. навука, 2013. 283 с.
3. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функция в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
4. Сибгатулина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2011. 61 с.
5. Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С., Исакова Т.И., Журавель И.А., Степанова С.И., Сербин А.Г., Картмазова Л.Ф. Практикум по фармакогнозии. Харьков: Изд-во НФаУ Золотые страницы, 2003. 512 с.
6. Armstrong G.A., Hearst J.E. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J*. 1996. **10** (2). P. 228–237.
7. Barz W., Bless W., Borger-Papendorf G., Gunia W., Mackenbrock U., Meier D. Phytoalexins as part of induced defence reactions in plants: their elicitation, function and metabolism. *Ciba Found Symp*. 1990. 154. P. 140–153.
8. Bouvier F., D'Harlingue A., Backhaus R.A., Kumagai M.H., Camara B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Europ. J. of Biochem*. 2000. **267** (21). P. 6346–6352.
9. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol. J*. 1995. **28**. P. 25–30.
10. Buer C.S., Imin N., Djordjevic M.A. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Biology*. 2010. **52** (1). P. 98–111.
11. Cuttriss A., Pogson B. Plant pigments and their manipulation. Carotenoids. Ed. by K.M. Davies. *Annual plant reviews*. 2004. **14**. P. 57–82.
12. Fliegmann J., Schroder G., Schanz S., Britsch L., Schroder J. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*) and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology*. 1992. **18**, P. 489–503.
13. Fry S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 1986. **37**. P. 165–186.
14. Gehlet R., Schoppner F., Kindl H. Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*: purification and induction in response to fungal infection. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 1990. **3**. P. 444–449.
15. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992. **13**. P. 435–448.
16. Grana E., Costas-Gil A., Longueira S., Celeiro M., Teijeira M., Reigosa M.J., Sanchez-Moreiras A.M. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *Journal of Plant Physiology*. 2017. **218**. P. 45–55.
17. <https://commons.wikimedia.org>
18. Ikeda R., Uyama H., Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly (phenylene oxide) laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules*. 1996. **29**. P. 3053–3054.

19. Jeandet P., Line A., Breuil D., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, anti-fungal activity and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**. P. 2731–2741.
20. Langcake P., Pryce R.J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*. 1977. **16**. P. 1193.
21. Langcake P., Pryce R.J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*. 1976. **9**. P. 77–86.
22. Meyer K., Kohler A., Kauss H. Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS*. 1991. **290**, N 1–2. P. 209–212.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 1962. N 15. P. 473–497.
24. Parry A.D., Babiano M.J., Horgan R. The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta*. 1990. **182**. P. 118–128.
25. Ruban A.V., Phillip D., Young A.J., Horton P. Excited-state energy level does not determine the differential effect of violaxanthin and zeaxanthin on chlorophyll fluorescence quenching in the isolated light-harvesting complex of photosystem II. *Photochemistry and Photobiology*. 1998. **68**, N 6. P. 829–834.
26. Santamaria A.R., Mulinacci N., Valletta A., Innocenti M., Pasqua G. Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J. Agric. Food Chem.* 2011. **59**. P. 9094–9101.
27. Shibuya N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry*. 1984. **23**, N 10. P. 2233–2237.
28. Sun B., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998. **46**. P. 4267–4274.
29. Tonami H., Uyama H., Kobayashi S., Rettig K., Ritter H. Chemoenzymatic synthesis of a poly(hydroquinone). *Macromol. Chem. Phys.* 1999. **200**. P. 1998–2002.
30. Vuong T.V., Franco C., Zhang W. Treatment strategies for high resveratrol induction on *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. *Biotechnology Reports*. 2014. N 1. P. 15–21.
31. Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D.M., Sporns P. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. Ed. by E. Wrolstad. Pigments and colorants. 2005. F. 4. P. 175–176.

Отримано 12.07.2018

## REFERENCES

1. Baraboy, V.A. (2009). Phenolic compounds of the grapevine: structure, antioxidant activity, application. *Biotechnologiya*, 2 (2), pp. 67-75 [in Russian].
2. Volyinets, A.P. (2013). Phenolic compounds in plant life. Minsk: Belorus. navuka. 283 s. [in Russian].
3. Zaprometov, M.N. (1993). Phenolic compounds. Propagation, metabolism and function in plants. M.: Nauka. 272 s. [in Russian].
4. Sibgatullina, G.V., Haertdinova, L.R., Gumerova, E.A., Akulov, A.N., Kostiukova, Yu.A., Nikonorova, N.A. & Rumiantseva, N.I. (2011). Methods for determining the redox status of cultivating plant cells. Kazan: Kazanskiy (Privolzhskiy) Federalnyiy universitet, 61 s.
5. Kovalev, V.N., Popova, N.V., Kislichenko, V.S., Isakova, T.I., Zhuravel, I.A., Stepanova, S.I., Serbin, A.N., Seraia, L.M. & Kartmazova, L.S. (2003). Workshop on pharmacognosy. Kharkov: Izd-vo NFaU Zolotyie stranitsyi, 512 p. [in Russian].
6. Armstrong, G.A. & Hearst, J.E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.*, 10 (2), pp. 228-237.
7. Barz, W., Bless, W., Borger-Papendorf, G., Gunia, W., Mackenbrock, U. & Meier, D. (1990). Phytoalexins as part of induced defence reactions in plants: their elicitation, function and metabolism. *Ciba Found Symp.*, 154, pp. 140-153.
8. Bouvier, F., D'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kumagai, M.H. & Camara, B. (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Europ. J. of Biochem.*, 267 (21), pp. 6346-6352.

9. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol. J.*, 28, pp. 25-30.
10. Buer, C.S., Imin, N. & Djordjevic, M.A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *J. of Integr. Biol.*, 52 (1), pp. 98-111.
11. Cuttriss, A. & Pogson, B. (2004). Plant pigments and their manipulation. *Carotenoids*. Ed. by K.M. Davies. Annual plant reviews, 14, pp. 57-82.
12. Fliegmann, J., Schroder, G., Schanz, S., Britsch, L. & Schroder, J. (1992). Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*) and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology*, 18, pp. 489-503.
13. Fry, S.C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 37, pp. 165-186.
14. Gehlet, R., Schoppner, F. & Kindl, H. (1990). Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*: purification and induction in response to fungal infection. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 3, pp. 444-449.
15. Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, pp. 435-448.
16. Grana, E., Costas-Gil, A., Longueira, S., Celeiro, M., Teijeira, M., Reigosa, M.J. & Sanchez-Moreiras, A.M. (2017). Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. *Journal of Plant Physiology*, 218, pp. 45-55.
17. <https://commons.wikimedia.org>
18. Ikeda, R., Uyama, H. & Kobayashi, S. (1996). Novel synthetic pathway to a poly (phenylene oxide) laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid. *Macromolecules*, 29, pp. 3053-3054.
19. Jeandet, P., Line, A., Breuil, D., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *J. Agric. Food Chem*, 50, pp. 2731-2741.
20. Langcake, P. & Pryce, R.J. (1977). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16, p. 1193.
21. Langcake, P. & Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, pp. 77-86.
22. Meyer, K., Kohler, A. & Kauss, H. (1991). Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS*, 290 (1-2), pp. 209-212.
23. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15, pp. 473-497.
24. Parry, A.D., Babiano, M.J. & Horgan, R. (1990). The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta*, 182, pp. 118-128.
25. Ruban, A.V., Phillip, D., Young, A.J. & Horton, P. (1998). Excited-state energy level does not determine the differential effect of violaxanthin and zeaxanthin on chlorophyll fluorescence quenching in the isolated light-harvesting complex of photosystem II. *Photochemistry and Photobiology*, 68 (6), pp. 829-834.
26. Santamaria, A.R., Mulinacci, N., Valletta, A., Innocenti, M. & Pasqua, G. (2011). Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J. Agric. Food Chem*, 59, pp. 9094-9101.
27. Shibuya, N. (1984). Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry*, 23 (10), pp. 2233-2237.
28. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem*, 46, pp. 4267-4274.
29. Tonami, H., Uyama, H., Kobayashi, S., Rettig, K. & Ritter, H. (1999). Chemoenzymatic synthesis of a poly(hydroquinone). *Macromol. Chem. Phys.*, 200, pp. 1998-2002.
30. Vuong, T.V., Franco, C. & Zhang, W. (2014). Treatment strategies for high resveratrol induction on *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. *Biotechnology Reports*, 1-2, pp. 15-21.
31. Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D.M. & Sporns, P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*. Ed. by E. Wrolstad. *Pigments and colorants*, F. 4, pp. 175-176.

Received 12.07.2018

ВЛИЯНИЕ ОКСИКОРИЧНЫХ И ОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПЛАСТИДНЫХ ПИГМЕНТОВ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ ВИНОГРАДА (*VITIS VINIFERA*) IN VITRO

А.Ф. Лиханов<sup>1</sup>, А.В. Середя<sup>2</sup>, О.Л. Кляченко<sup>3</sup>, М.Д. Мельничук<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной экологии Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Китайско-Украинский Институт Наук о Жизни, Чжудзи

<sup>3</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

<sup>4</sup>Агрономика LTD, с. Чайки, Киево-Святошинский р-н., Киевская обл.

Установлено, что сиреневая, ванилиновая, кофейная и феруловая кислоты в концентрации 1 мкМ в составе питательной среды Мурасиге—Скуга стимулируют накопление пластидных пигментов в листьях винограда *in vitro*. Наиболее сильный биологический эффект по содержанию хлорофилла *a* оказывала феруловая (4-гидрокси-3-метоксibenзойная) кислота, в структуре которой содержится метоксигруппа. Замещение одной оксигруппы на метоксигруппу у оксикоричных кислот существенно повышает их стимулирующее действие. В культуре *in vitro* содержание каротиноидов в листьях винограда повышалось в 1,8 раза в условиях добавления в питательную среду ванилиновой кислоты. Совместное действие фенольных кислот на количественные показатели пигментов фотосинтетического аппарата оказывало менее выраженный, скомпенсированный эффект. Выяснено, что феруловая кислота, поступающая в ткани микропобегов винограда непосредственно из питательной среды, повышает в листьях содержание стилбеноидов, в частности ресвератрола и пiceiда, которые имеют высокий антиоксидантный потенциал и выполняют функцию фитоалексинов.

**Ключевые слова:** виноград, оксикоричные кислоты, оксibenзойные кислоты, пигменты, фенольные вещества, ресвератрол

INFLUENCE OF OXYCORIC AND OXYBENZOIC ACIDS ON SYNTHESIS OF PLASTID PIGMENTS AND FENOLIC COMPOUNDS IN THE LEAVES OF COMMON GRAPE VINE (*VITIS VINIFERA*) IN VITRO

A.F. Likhonov<sup>1</sup>, O.V. Sereda<sup>2</sup>, O.L. Klyachenko<sup>3</sup>, M.D. Melnychuk<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine

37 Acad. Lebedeva St., Kyiv, 03143, Ukraine

e-mail: likhanov.bio@gmail.com

<sup>2</sup>Chinese-Ukrainian Institute of Life Sciences,

26 South Wenzhou str., Zhuji city, prov. Zhejiang, China

e-mail: tritavki@ukr.net

<sup>3</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

15 Heroiv oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine

<sup>4</sup>Agromonica LTD

28 Lobanovskogo St., v. Chaiky, Kyiv-Sviatoshyn distr. Kyiv region, 08130, Ukraine

e-mail: melnychuk.maks@gmail.com

The syringic, vanillic, caffeic and ferulic acids in Murashige and Skoog medium in concentrations of 10<sup>-6</sup> M induced accumulation of plastid pigments in leaves of common grape vine *in vitro*. Ferulic acid (3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid) had the highest biological effect on chlorophyll *a* content. It was established that the stimulating effect of oxycoric acids greatly increased with substitution of one oxy group with a methoxy group. Carotenoid content in grape vine leaves cultured *in vitro* increased by 1.8 times in the presence of vanillic acid in culture medium. The joint effect of phenolic acids on quantitative indices of photosynthetic pigments was more moderate. Ferulic acid, introduced in grape vine microshoot tissues directly from the culture medium, induced increased levels of stilbenoids such as resveratrol and piceid that are highly active antioxidants and act as phytoalexins.

**Key words:** grapes, oxycoric acids, oxybenzoic acids, pigments, phenolic compounds, resveratrol.