УДК 581.144.4.085:634.71

ОЦІНКА МІЖСОРТОВОЇ СПОРІДНЕНОСТІ РОСЛИН МАЛИНИ (*RUBUS IDAEUS* L.) ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПРОФІЛЯМИ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

А. Ф. Ліханов, кандидат біологічних наук

Виявлено локалізацію оптично активних сполук у тканинах стебел і показано сортоспецифічність будови ендодерми, розвиненості луб'яних волокон та серцевинних променів сортів малини української селекції. Встановлено, що за оптимальних умов вирощування рослин фенольні комплекси до початку цвітіння виявляють тісні біохімічні зв'язки між близькими за походженням сортами малини.

Ключові слова: *малина, флавоноїди, фенольні речовини,таніни, стебло, листки, автофлуоресценція*

Малина (*Rubus idaeus* L.) – цінна ягідна культура, яка характеризується значним вмістом фенольних сполук [3]. Уявлення щодо ролі фенолів у регуляції фізіологічних процесів рослинних організмів значно розширилися [2]. Показано, що флавоноїди у клітинах синтезуються у відповідь на стимули навколишнього середовища і виконують регуляторні функції [2, 7]. Останні повідомлення пояснюють механізми впливу флавоноїдів на транспорт ауксинів. Установлено, що високий вміст деяких флавононів гальмує базипетальний транспорт фітогормонів, який відновлюється за умов збільшення концентрації флавонолів [7, 9]. Високі концентрації флавонона нарінгенина уповільнюють розвиток волокон у тканинах рослин бавовнику (*Gossypium hirsutuma* L.). Явище гальмування процесів розтягнення клітин пояснюють пригніченням експресії генів, що відповідальні за синтез фермента флавонон-3-гідроксилази (F3H), субстратом якого є нарінгенин [9]. Фенольні кислоти і флавоноїди приймають участь в імунних реакціях рослин, пригнічують патогенні мікроорганізми та гриби [6]. Наприклад,

листки і плоди яблуні (*Malus domestica* Borkh), які інфіковані патогеном (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter), характеризуються підвищеним вмістом хлорогенової кислоти та кон'югатів кверцетину (рутину, кверцитріну й ізокверцитріну) [8].

У листках малини (*Rubus idaeus* L.) ідентифіковано терпеноїди, глікозиди кверцетину і кемпферолу, антоціани (ціанідин-3-софорозид, ціанідин-3-глікозилрутинозид і ціанідин-3-глюкозид), а також дубильні речовини і таніни, до складу яких входить галова та елагова кислоти (елагітаніни, галотаніни) [3,6]. Елагітаніни і антоціани відзначаються антиоксидантними властивостями й захищають тканини та органи рослин від негативної дії стресових чинників. У супліддях малини фенольні сполуки представлені елаготанінами і антоціанами [4, 5], вміст й якісний склад яких 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), органічних кислот й низьким – флавоноїдів та сухих розчинних речовин у плодах [5].

Мета досліджень – біохімічне профілювання і дослідження локалізації оптично активних речовин у тканинах вегетативних органів й визначення потенційних зв'язків між якісним складом фенольних комплексів та материнськими формами сортів малини української селекції.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень відбирали листки і стебла десяти сортів малини з колекції НУБіП України: Примара, Козачка Галинка, Космічна, Осіння, Брусвяна, Барабашка, Промінь, Улюблена Сича та Відбірна 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 пластинах Кізельгель F_{254} (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 малини об'ємом 7 мкл. Після просушування хроматограми обробляли 5%-ним EtOH розчином $AlCl_3$, нагрівали 5 хв за температури 105^0C і досліджували в УФ (365 нм). Спектрофотометричний аналіз фенольних речовин здійснювали на сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop (Південна Корея). Гістологічний аналіз стебел, 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 виконували за допомогою програми Statistica 6.

Результати досліджень. Хроматографічне профілювання продуктів вторинного метаболізму у листках сортів малини виявило гідролізовані таніни – похідні галової і елагової кислот й їх кон’югати (винної, хінної та шикімової кислот з оксикоричними), кофейну, п-кумарову та ферулову (депсиди типу хлорогенової, ізохлорогенової, неохлорогенової) кислоти; катехіни, конденсовані таніни (проантоціанідини) та флавоноїди (головним чином глікозиди кверцетину та кемпферолу). До того ж, у складі листків містились нор-, ди- і тритерпеноїди, а також стерини та їхні ефіри. Співвідношення біохімічних складових залежало від сортових особливостей, фази вегетації, абіо- та біогенних стресових чинників.

Вторинні метаболіти листків сортів малини за якісним складом виокремлювались у дві основні групи – фенольну та терпеноїдну. На початкових стадіях розвитку у молодих листках накопичувалась значна кількість терпеноїдів, вміст яких зменшувався на фоні збільшення загального пулу флавоноїдів і оксикоричних кислот, зокрема кавової, ферулової та п-кумарової, а також саліцилової. Проте у сортів Примара і Галинка ідентифіковано метильовану форму саліцилової кислоти – метилсаліцилат, який завдяки високій ліпофільності легко проникає через мембранні бар’єри

органоїдів, плазмалеми й виконує сигнальні функції на міжклітинному рівні.

З'ясовано, що висока концентрація оксикоричних кислот, у тому числі ферулової, для якої характерне інтенсивне світіння у блакитному спектрі, була характерна для вторинних клітинних стінок елементів ксилеми на початку здерев'яніння тканин, а також у клітин периферійної зони склеренхімних волокон (рис. 1). У рослин малини розподіл, вертикальний і радіальний транспорт оптично активних метаболітів по стеблах мав деякі сортові відміни. Топологічно у первинній корі стебла малини виділявся екзокортекс, що побудований з декількох шарів здерев'янілих дещо облітерованих клітин, мезокортекс, який представлений великими клітинами паренхіми та ендокортекс, до складу якого входять один, два або три шари клітин ендодерми, між якими розташовані ряди клітин з високим умістом крохмалю. За морфологією клітини ендодерми таблитчасті і 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 світились у діапазоні довжини хвиль 420–470 нм.

Локалізація і розподіл оптично активних компонентів у клітинних стінках тканин нерівномірна. Найінтенсивнішу автофлуоресценцію виявлено для фенолкарбонових кислот в антиклінальних (радіальних) та внутрішніх тангентальних (поперечних) стінках. Результати анатомічних досліджень показали, що найпластичнішими елементами в будові стебел сортів малини є серцевинні промені і ендодерма, основні відміни яких пов'язані з морфологією, інтенсивністю розвинення тканин й вмістом у протопластах та клітинних стінках оптично активних сполук. Так, у малини сорту Осіння ендодерма представлена трьома рядами таблитчастих клітин із здерев'янілими стінками, у сортів Брусвяна і Осіння вона одно- або дворядна. Клітинні стінки інтенсивно автофлуоресціюють у синьому (420-470 нм) спектрі.

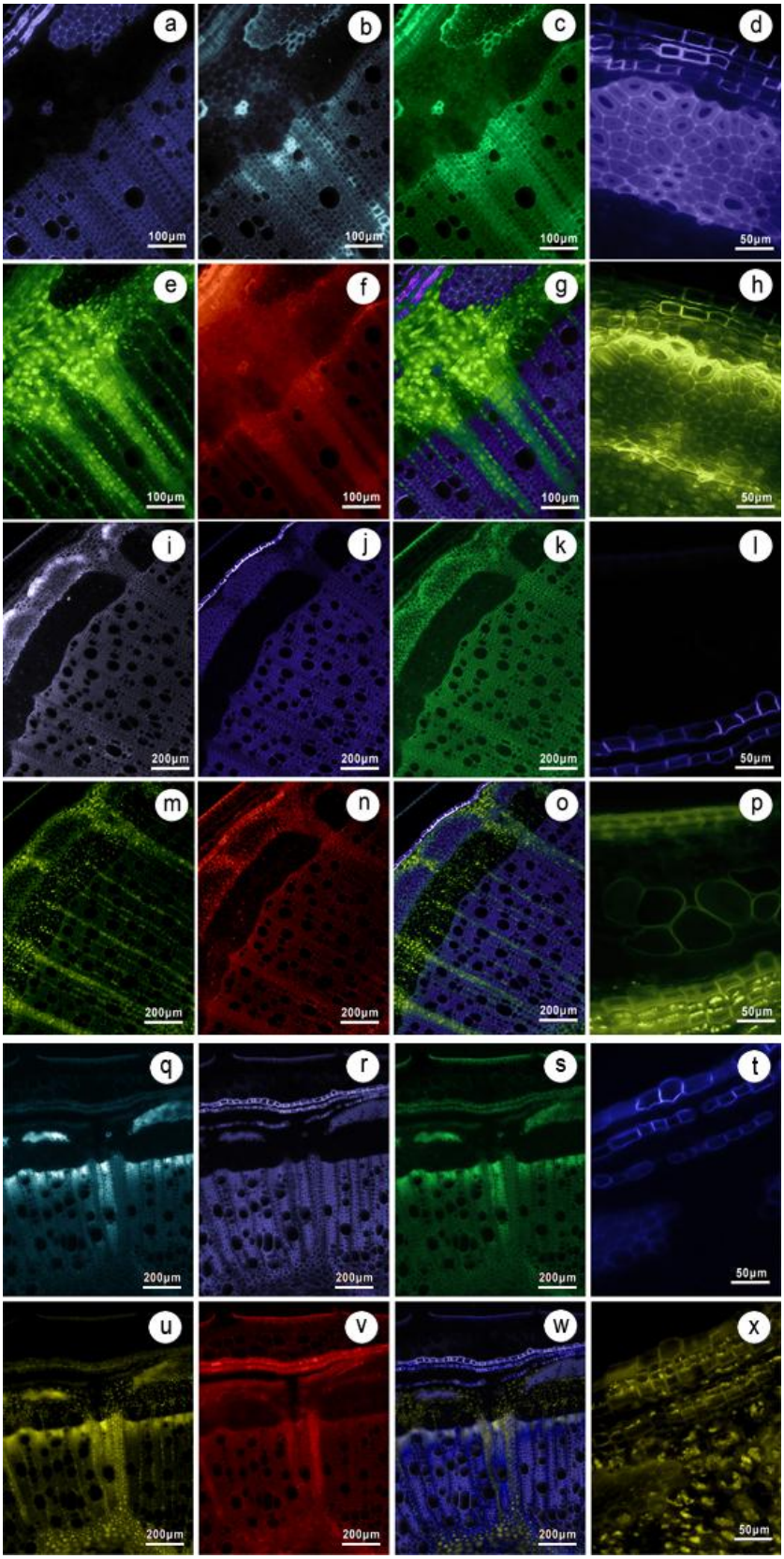

Рис. 1. Автофлуоресцеція вторинних метаболітів у тканинах стебла сортів малини Осіння (a-h), Галинка (i-p) і Брусвяна (q-x): оптичні фільтри

(a,d,j,l,r,t) – 420-470 нм; (b,i,q) – 460-500; (c,k,s) – 505-555; (e, h,m,p,u,x) –546-575; (f,n,v) – 640-690 нм

Яскраве світіння у блакитному спектрі (480 нм), яке характерне для фенолкарбонових кислот, спостерігалось у луб'яних волокнах і прикамбіальній зоні ксилеми. Люмінесценція фенольних сполук до та після обробки хромогенними реактивами спрощує можливість їх ідентифікації на свіжих зрізах.

Методом тонкошарової хроматографії нами розділено компоненти фенольних сполук сортів малини (рис. 2). Всього у метанольних екстрактах листків визначено 19 сполук з R_f у діапазоні від 0,05 до 0,98. Оксикоричні і оксибензойні кислоти виявляли інтенсивну люмінесценцію у синьому і блакитному спектрах (верхня й середня частини хроматограми). Таніни (нижня частина), навпаки, інтенсивно поглинали УФ світло і були помітні через затемнення, а флавоноїди мали інтенсивну люмінесценцію у помаранчевому, жовтогарячому, жовтому, зеленому і блакитному тонах після обробки пластини хлоридом алюмінію (5 % в EtOH).

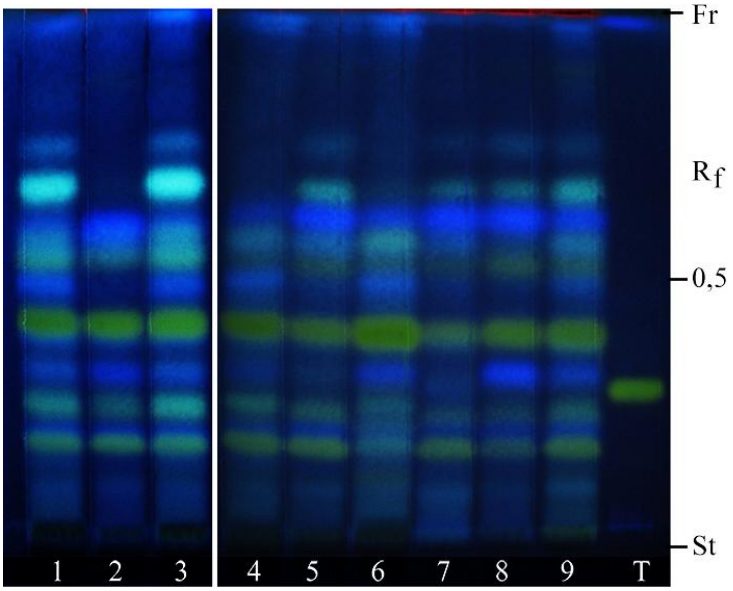

Рис. 2. Хроматограма флавоноїдів листків сортів малини: 1– Галинка; 2 – Примара; 3 – Промінь; 4 – Космічна; 5 – Відбірна; 6 – Улюблена Сича; 7 – Брусвяна; 8 – Козачка; 9 – Барабашка; Т – стандарти: рутин і саліцилова кислота (5 мкг).

Вміст фенокарбонових кислот і флавоноїдів у листках визначали із застосуванням спектрофотометричного аналізу. Для флавоноїдів характерним є поглинання в УФ та видимій частинах спектра (210-600 нм). Спектр поглинання флавоноїдів має, зазвичай, дві смуги: першу (I) у довгохвильовій (320-380 або 490-540 нм для антоціанідинів), другу (II) – короткохвильовій (210-290 нм) частинах спектрів. Розташування смуг поглинання є характерною ознакою окремих груп флавоноїдів. Флаванони и флавонолы відрізняються від інших флавоноїдів наявністю II смуги в області 270-290 нм і I у вигляді плеча за 310-330 нм. Специфічною ознакою флавонів і флавонолів є положення смуги I у області 320-355 та 340-385 нм (F). Показано, що за спектральними характеристиками поглинання УФ вторинні метаболіти розділяються на чотири групи: елагову кислоту і елагітаніни (B), оксикоричні кислоти (C), флавоноїди (F) та (D) – конденсовані таніни, у тому числі проантоціанідини (рис. 3.).

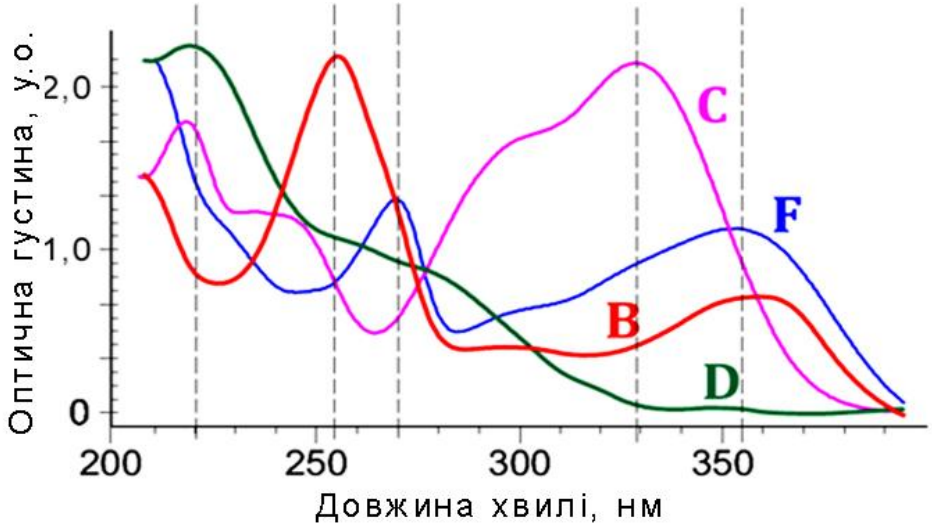

Рис. 3. Спектри поглинання фенольних сполук метанольних екстрактів листків малини (дика форма)*:* B – елагова кислота та елагітаніни; C – оксикоричні кислоти; F – флавоноїди; D – конденсовані таніни

У сформованих листках малини синтез терпеноїдів уповільнюється і метаболізм поступово зміщується в бік збільшення пулу фенолів, кількість яких порівняно з періодом формування листків підвищується у декілька

разів. Проте для деяких сортів (Брусвяна, Козачка) накопичення фенолів не є характерним.

Виявлено, що деякі сорти малини української селекції (селекціонери Шеренговий П.З., Шеренговий В.П., Андрусик Ю.Ю.) можуть бути оцінені за наявністю, або відсутністю певних вторинних метаболітів, які відіграють роль маркерів і пов'язані з морфологічними та фізіологічними ознаками рослин. Це припущення підтверджено результатами кластерного аналізу, яке грунтується на принциповому положенні наявності сортових відмінностей у формуванні ізоферментних комплексів, відповідальних за фенілпропаноїдний та флавоноїдний блоки синтезу фенольних сполук [2]. Отримана нами дендрограма біохімічної спорідненості сортів малини української селекції складається з двох основних кластерів (рис. 4). До першого входять сорти Промінь, Галинка, Барабашка, Космічна і Улюблена Сича, Брусвяна й Козачка (кластер Іа), до другого – Відбірна та Примара (кластер Іб).

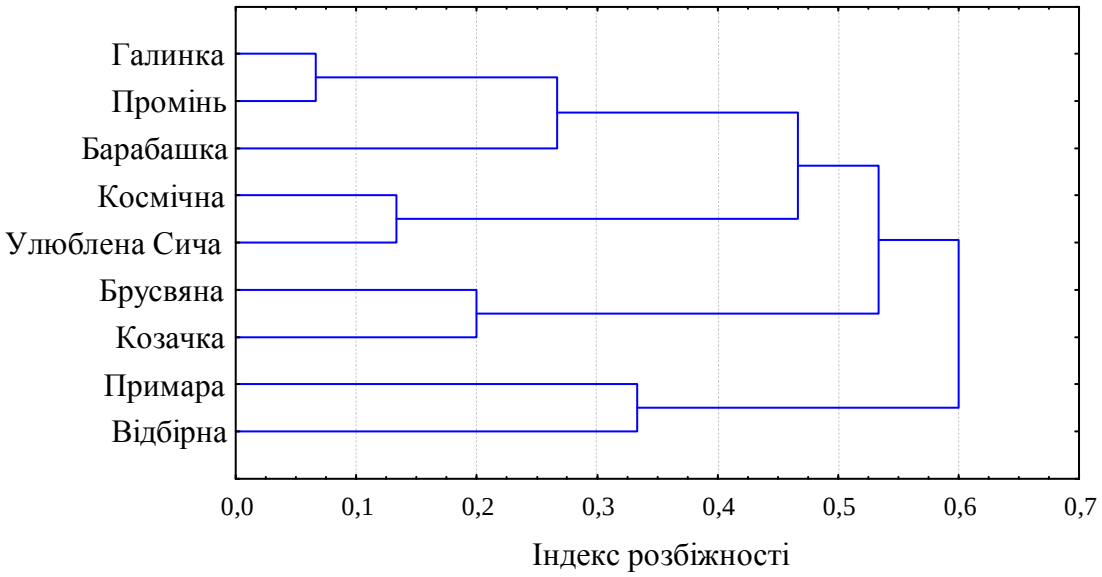

Рис. 4. Дендрограма біохімічної спорідненості, яка побудована за поліморфізмом якісного складу фенольних сполук у листках сортів малини

За поступовим зменшенням рівня розбіжності якісного складу фенольних комплексів у листках кластер Іа розкладався на два підкластери (ІІа і ІІб), у яких сорти об'єднувались у дві групи. Перша (ІІІа) –

представлена сортами Промінь, Галинка і Барабашка. За коефіцієнтом розбіжності найспоріднішими з них були сорти Промінь і Галинка (IP=0,06), що створені схрещуванням сортів Новокитаївська, Сонце Києва та Благородна (рис. 5).

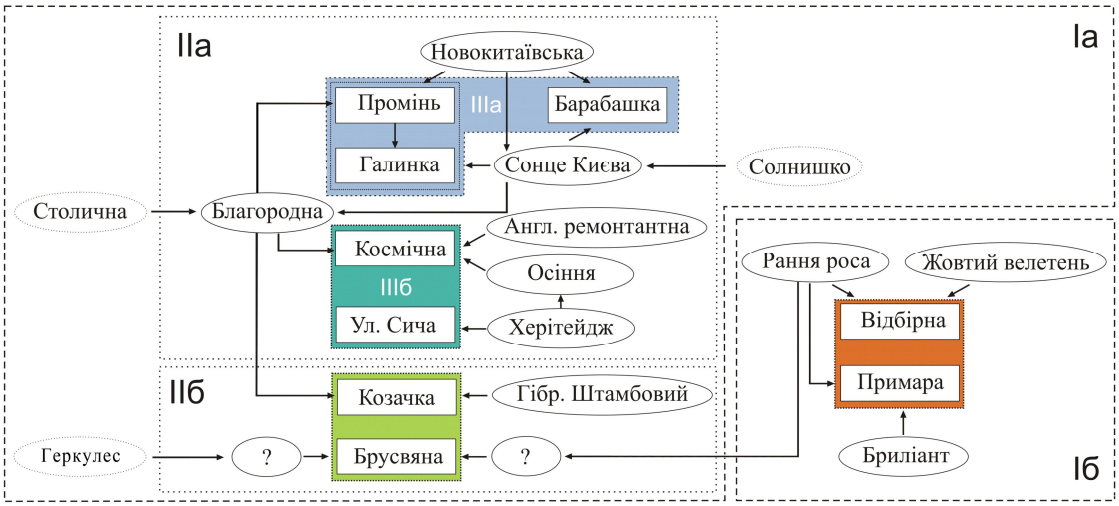

Рис. 5. Міжсортові зв'язки, їх відповідність кластерам біохімічної спорідненості та вихідному селекційному матеріалу рослин сортів малини української селекції (еліпсами обведено вихідні материнські сорти)

За складом фенольних комплексів подібними були сорти Козачка (отриманий схрещуванням Благородної з гібридом Штамбовий) та Брусвяна (дані щодо вихідного селекційного матеріалу не підтверджені). За нашими даними, ці сорти накопичують у листках найменшу кількість фенольних сполук і, зокрема, саліцилової кислоти. Водночас 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 й виконує сигнальну функцію у запуску каскадних механізмів формування індукованої стійкості рослин проти патогенів. Окрім того, в умовах *in vitro* у рослин сорту Брусвяна значно збільшувався пул терпеноїдів і стеринів, які цінуються за фармакологічні властивості.

Стає очевидним, що за комплексом фенольних сполук чітко виокремлюються сорти малини Відбірна і Примара (кластер Iб). Перший отримано схрещуванням сорту Рання Роса з Жовтим Велетнем, другий –

Рання роса і Бриліант, які накопичують у листках значну кількість оксикоричних кислот, проантоціанідинів та флавоноїдів.

Висновки

1. Вторинні метаболіти фенольної природи, їх якісний і кількісний склад корелюють з іншими біохімічними й морфо-фізіологічними ознаками рослин, які відносяться до критеріїв ідентифікації сортів малини української селекції.

2. Тісний зв'язок між біохімічним складом фенольних сполук і фенотиповими ознаками підтверджує тезу щодо регуляторної ролі вторинних метаболітів у формуванні адаптивних реакцій рослин малини до чинників навколишнього природного середовища.

3. У період активного весняного росту якісний склад фенольних сполук у листках малини є високоінформативним показником, який характеризує загальний стан рослин та походження сортів.

4. Отримані результати важливі для селекційного процесу з метою створення сортів малини з підвищеним вмістом фенольних сполук.

Список літератури

1. Charles S. B., Muday G. K. The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of arabidopsis roots to gravity and light // The Plant Cell. – 2004. – V. 16 (5) . – Pp. 1191-1205.

2. Charles S. B., Imin N., Djordjevic M. A. Flavonoids: new roles for old molecules // Journal of Integrative Plant Biology. – 2010. – V. 52 (1). – Pp. 98-111.

3. Gülçin I., Topal F., Çakmakçı R., Bilsel M., Gören AC., 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. – V. 76(4). – Pp. 585-593.

4. Hakkinen S., Heinonen M., Karenlampi S., Mykkanen H., Ruuskanen J., Torronen R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries // Food Research International. – 1999. – V. 32. – Pp. 345–353.

5. Jorgen H., Jorgensen L., Newman M., Christensen L., Mazur SP, Nes A, Wold AB, Remberg SF, Aaby K. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons // J. Food Chem. – 2014. – V.160. – Pp. 233-240.

6. Kähkönen M., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J.P., Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries // J. Agric. Food Chem. – 2012. – V. 60(5). – Pp. 1167-74.

7. Peer W. A., Bandyopadhyay A., Blakeslee J., Makam S. N., Chen R., Masson P. H., Murphy A. S. Variationin expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transportin Arabidopsis thaliana // The Plant Cell. – 2004. – V.16. – Pp. 1898–1911.

8. Petkovsvek M. M., Stampar F., Veberic R. Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen // Journal of Plant Pathology. – 2008. – V. 90(1). – Pp. 49-55.

9. 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). – Pp. 86-95.

Оценка межсортового родства растений малины (*Rubus idaeus* L.) по биохимическим профилям фенольных соединений

Лиханов А.Ф.

Выявлена локализация оптически активных соединений в тканях стеблей и показана сортоспецифичность строения эндодермы, развития лубяных волокон и сердцевинных лучей у сортов малины украинской селекции. Установлено, что при оптимальных условиях выращивания растений

фенольные комплексы до начала цветения выявляют тесные биохимические связи между близкими по происхождению сортами малины.

Ключевые слова: *малина, сорт, стебель, листья, фенольные вещества, флавоноиды, таннины, автофлуоресценция*

Identification of intervarietal affinity of raspberry (*Rubus idaeus* L.) plants on biochemical profiles of phenolic compounds

Likhanov A.F.

The localization of the optically active substances in the tissues of raspberry stems and specific of varieties features in the structure of the endoderm, the development of bast fibers and medullary rays are investigated. It is established that phenolic complexes of leaves before flowering exhibit close biochemical links between similar origin raspberry cultivars under the same conditions of plant cultivation.

Keywords: *raspberry, cultivar, stem, leaves, phenolics, flavonoids, tannins, autofluorescence*