



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 582.711.712:574.56.085.2

© 2016

О.О. Олійник

А.А. Ключаваденко,

*кандидат сільсько-
господарських наук*

А.Ф. Ліханов,

*кандидат
біологічних наук*

*Національний
університет біоресурсів
і природокористування України*

М.Д. Мельничук,

*академік НААН,
доктор біологічних наук*

*Національна академія аграрних
наук України*

ВПЛИВ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК НА ЕФЕКТИВНІСТЬ УВЕДЕННЯ СОРТІВ ROSA DAMASCENA MILL. У КУЛЬТУРУ IN VITRO

Мета. Дослідження зв'язків між сортоспецифічністю складу поліфенольних сполук і регенераційними процесами експлантатів троянди в умовах *in vitro*. **Методи.** Культура тканин і органів рослин *in vitro*, тонкошарової хроматографії, спектрофотометрії. **Результати.** Установлено, що найбільший уміст фенольних сполук характерний для сортів троянди Лада і Радуга, найменший — у сорту Лань. Визначено, що підвищений уміст фенольних сполук та їх нагромадження в тканинах і живильному середовищі негативно впливають на ефективність стерилізації й регенераційні процеси первинних експлантатів *in vitro*. **Висновки.** Якісний склад та кількість простих фенолів і конденсованих танінів у листках троянди ефіроолійної сортів Лада, Лань, Радуга є маркером потенційної здатності пагонів до регенерації сортів троянди ефіроолійної. За умов умісту фенольних сполук у листках первинних експлантатів у концентрації нижче за 60 мг/г сирової маси ефективність уведення рослин у культуру *in vitro* підвищується.

Ключові слова: троянда ефіроолійна, експлантати, живильне середовище, фенольні сполуки, культура *in vitro*.

У листках рослин родини *Rosaceae* синтезуються біологічно активні сполуки фенольної природи: аглікони флавоноїдів — кемпферол і кверцетин та їхні глікозиди, пірокатехін, пірогалол, евгенол, проціанідини, серед яких основним є епікатехін [2]. У молодих стеблах виявлено галову і ферулову кислоти, епікатехін, галатанін і димери проціанідинів. У тканинах здрев'янілих стебел накопичуються: флавоон-3-ол(-)-епікатехін, мономери, димери і полімери проціанідинів. У пелюстках троянди додатково синтезується

елагова, гентизинова, кавова, протокатехова, п-гідробензойна, п-кумарова, сирінгова, ванілінова та саліцилова кислоти, які у стеблах зазвичай не виявляються або їх кількість незначна [7, 8]. Фенольні сполуки, зокрема катехіни й таніни, здатні захищати травмовані і прилеглі до них тканини від вільних радикалів, які утворюються внаслідок активного дихання клітин [1]. Під впливом підвищеної дози УФ-випромінювання клітини троянд накопичують приблизно в 15 разів більше флавоноїдів і здатні утворювати вдвічі більшу

кількість ДНК [8]. Окиснення поліфенолів призводить до утворення сполук, які гальмують ростові процеси й ускладнюють регенерацію тканин [10]. У культурі клітин троянди на синтез загальних фенолів, зокрема лейкоантоціанів, позитивно впливає збільшення концентрації екзогенної глюкози, водночас синтез останніх помітно знижується з підвищенням умісту в живильному середовищі нітратів, проте на синтез загальних фенолів цей чинник істотно не впливає [2, 6].

Зацікавленість динамікою синтезу і локалізацією поліфенолів у тканинах рослин роду *Rosa* L. пояснюється їх значним впливом на регенераційні процеси в культурі *in vitro* [9, 10].

Мета досліджень — вивчення зв'язків між сортоспецифічністю складу поліфенольних сполук і регенераційними процесами експлантатів троянди в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень, які проводили у 2013–2015 рр., використовували живці троянд сортів Лань, Лада, Радуга української селекції (автори Л.Г. Назаренко та Л.А. Грищенко). Радуга — екологічно пластичний швидкоплідний сорт; кущ компактний, пагони середньої шипуватості, квітки яскраво-рожеві. Лань — технологічний сорт, стійкий до ураження іржею, низької шипуватості, з яскраво-рожевими квітками. Сорт Лада характеризується високою бутонуотворювальною здатністю, зимостійкістю, не уражується іржею, шипуватість середня, квітки блідо-рожеві [4]. Пагони завдовжки 20–30 см з пазушними бруньками були ізольовані з 2-річних рослин-донорів. Для зменшення інфікування рослинного матеріалу патогенами грибної та бактеріальної природи живці поміщали у посудини з водою і витримували в контрольованих умовах лабораторної кімнати за $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ та відносної вологості повітря — 60–70%. Для ефективного знешкодження екзогенної мікрофлори стерилізацію експлантатів проводили у 2 етапи: у нестерильних умовах і в умовах ламінарного боксу. У нестерильних умовах експлантати відмивали у мильному розчині 10–15 хв на шейкері, потім їх промивали у проточній воді 10–15 хв та ополіскували у дистильованій воді.

Стерилізацію експлантатів проводили розчинами: 70% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1–2 хв), 0,1% HgCl_2 (5–10 хв). Простерилізовані експлантати відмивали у стерильній дистильованій воді тричі по 10 хв у кожній порції. У стерильних умовах

Уміст і співвідношення фенольних сполук у листках троянди ефіроолійної

Сорт	Фенольні сполуки, мг/г		Співвідношення феноли/флавоноїди
	феноли	флавоноїди	
Лада	118,9±4,8	11,9±0,5	10,0±0,4
Радуга	109,1±4,4	11,7±0,5	9,3±0,4
Лань	63,0±2,5	10,8±0,4	5,8±0,2

їх розрізали на фрагменти завдовжки 1–1,5 см з однією брунькою [3]. Операції виконували в ламінарних боксах YLGH-19 (Німеччина).

Загальний уміст фенольних сполук у рослинному матеріалі визначали спектрофотометричним методом за використання реактиву Фоліна-Чокольтеу. Калібрувальний графік будували за галовою кислотою. Кількість флавоноїдів визначали у метанольних екстрактах (1:10) за $\lambda=419$ нм на сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop, послідовно додаючи до 500 мкл екстракту 300 мкл 0,1М розчину AlCl_3 і 500 мкл 1М CH_3COONa . Стандартом був кверцетин (Merk, Germany) [5].

Результати досліджень. За результатами наших досліджень, найбільший загальний уміст спирторозчинних фенольних сполук виявлено у листках троянди сортів Лада і Радуга, найменший — у сорту Лань (таблиця). Останній можна охарактеризувати як сорт з низьким рівнем синтезу фенольних сполук. Саме він виявив найвищу регенераційну здатність за підібраних нами умов стерилізації та

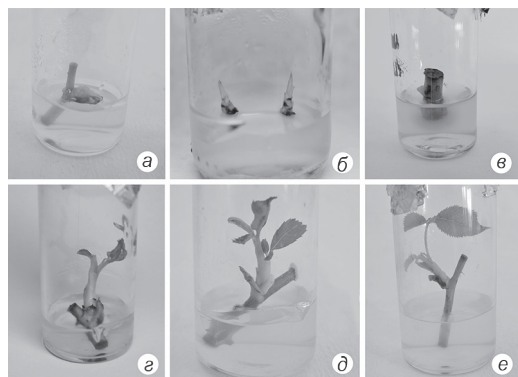


Рис. 1. Стерильні експлантати на етапі введення у культуру *in vitro*: а — сорт Лань; б — Лада; в — сорт Радуга (7-ма доба культивування); активація пазушних бруньок: г — сорт Лада; д — Радуга; е — сорт Лань (21-ша доба культивування)

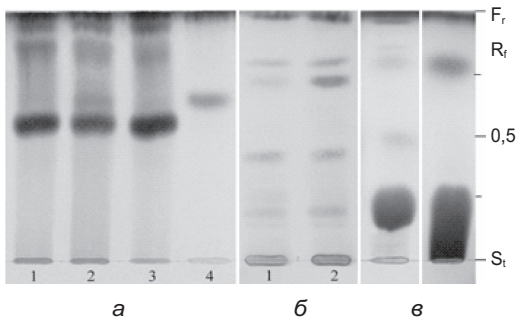


Рис. 2. Хроматограма екстрактів вторинних метаболітів троянди ефіроолійної, що містяться: а — у листках; б — у пагонах; в — виділяються у живильне середовище первинними експлантатами у разі введення в культуру *in vitro*: 1 — сорт Лань; 2 — Лада; 3 — сорт Радуга; 4 — дифузат сорту Лада: а — хлороформ — оцтова кислота — метанол — вода: v/v/v/v — 60/32/12/8 (обробка анісовим альдегідом); б — хлороформ — етилацетат — метанол — мурашина кислота: v/v/v/v — 50/40/10/10 (обробка 1%-м ваніліном і 5%-ю сірчаною кислотою); в — толуол — етилацетат — оцтова кислота — мурашина кислота — вода: v/v/v/v — 1/20/2/2/2 (обробка анісовим альдегідом)

культивування первинних експлантатів *in vitro*.

Різниця у кількісних показниках вмісту фенолів і флавоноїдів у сортів Лада і Радуга виявилася недостовірною. Флавоноїди в рослинному організмі виконують різні фізіологічні функції, тому співвідношення загальної кількості фенолів до флавоноїдів як специфічної групи високомолекулярних сполук (феноли/флавоноїди) є інформативним показником

спрямованості процесів вторинного метаболізму. Перевага масової частки речовин фенілпропановидного синтезу над флавоноїдним комплексом може характеризувати адаптаційну стратегію рослин. Установлено, що найменшим цей показник був у сорту Лань — 5,8, у сортів Лада і Радуга — 10 і 9,3 відповідно.

Варто зазначити, що у разі введення первинних експлантатів троянди у культуру *in vitro* в тканинах первинної кори, вторинної флоєми й паренхіми серцевинних променів відбувається інтенсивний синтез фенольних сполук, зокрема дубильних речовин і флавоноїдів. Вторинні метаболіти активно рухаються у базипетальному напрямі по ситоподібним трубочкам і клітинам паренхіми. Частина фенолів дифундує у живильне середовище і за умов достатньої кількості кисню окиснюється, решта (проантоціанідини, флавоноїди) утворює складні полімери, які здатні специфічно зв'язуватися з білками клітинних мембран, впливати на їхню селективність і трансмембранний перенос, істотно змінюючи функціональний стан живих клітин. Характер і спрямованість біохімічних процесів істотно залежать від якісного складу поліфенолів. Дослідження сортоспецифічних відмінностей у якісному складі фенольних сполук методом тонкошарової хроматографії свідчать, що у листках рослин сорту Лада порівняно з іншими міститься менша кількість катехинів, проте сортових відмінностей у їх якісному складі нами не виявлено. Також з'ясовано, що між регенераційною здатністю експлантатів і вихідним пулом фенольних

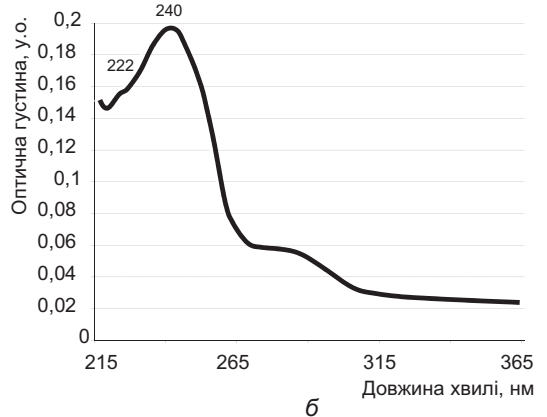
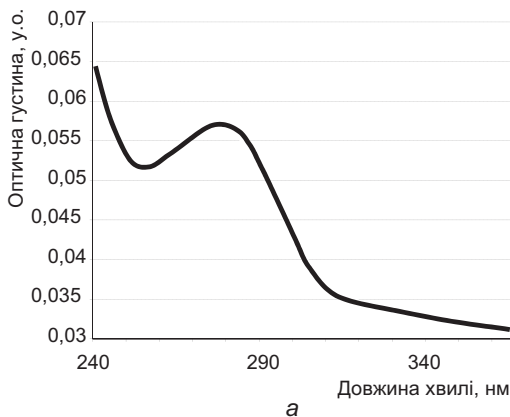


Рис. 3. Електронні спектри поглинання індивідуальних речовин, що дифундують у живильне середовище з пагонів троянди ефіроолійної сорту Лань: а — речовина з $R_f \sim 0,18$ (на хроматограмі чорна пляма), $\lambda_{max} = 280$ нм; б — $R_f \sim 0,80$ (пурпурна пляма), $\lambda_{max} = 240$ нм

сполук існує зворотний зв'язок. Так, визначено, що на етапі уведення в культуру *in vitro* найскладнішими для адаптації були сорти Лада і Радуга (рис. 1, б, в, г, д), найвища регенераційна здатність за підібраних нами умов стерилізації у сорту Лань (рис. 1, а, е).

Рослини першого з них містили у листках речовину (рис. 2, а), яка, наприклад, у сорту Лань виявлялася лише в живильному середовищі за культивування рослин в умовах *in vitro*.

Виділені й очищені з живильного середовища індивідуальні сполуки виявляли характерні для конденсованих танінів електронні спектри з максимумами поглинання у діапазоні 240–280 нм (рис. 3).

Оцінка впливу виділених з живильного середовища індивідуальних сполук виявила їхню здатність гальмувати проростання насіння редису, що підтвердило їх можливу роль у пригнічуванні регенераційних процесів пагонів.

Висновки

Якісний склад і кількість простих фенолів та конденсованих танінів у листках троянди ефіроолійної є маркером потенційної здатності пагонів сортів *Rosa damascena* Mill. до регенерації. За умов умісту фенольних сполук у листках первинних експлантатів у концентрації нижче за 60 мг/г сирової маси ефективність уведення рослин

у культуру *in vitro* істотно підвищується. Інтенсивність нагромадження у стебла троянди ефіроолійної фенольних сполук і швидкість їхньої дифузії у тверде живильне середовище характеризують ефективність умов стерилізації первинних експлантатів й оптимальність складу живильного середовища.

Бібліографія

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений/В.А. Андреева. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функция в растениях/М.Н. Запрометов. — М.: Наука, 1993. — 272 с.
3. Калинин Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений/Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. — К.: Наук. думка, 1992. — 232 с.
4. Пилунская О.А. Введение в культуру *in vitro* розы эфиромасличной//Науч. тр. КГАУ. — Симферополь, 1999. — Вып. 58. — С. 88–97.
5. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений/Х.Н. Починок. — К.: Наук. думка, 1976. — 336 с.
6. Функции и свойства антоцианов растительного сырья/А.М. Макаревич, А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович, В.Н. Решетников//Труды БГУ. — 2010. — Т. 4. — Вып. 2. — С. 1–11.
7. Charles S.B. Flavonoids: new roles for old molecules/S.B. Charles, N. Imin, M.A. Djordjevic//J. of Integrative Plant Biology. — 2010. — V. 52 (1). — P. 98–111.
8. Charles S.B. The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of arabidopsis roots to gravity and light/S.B. Charles, G.K. Munday//The Plant Cell. — 2004. — V. 16 (5). — P. 1191–1205.
9. Plant pigments and their manipulation: ed. by K.M. Davies//Annual plant reviews. — 2004. — V. 14. — 352 p.
10. Salekjalali M. Phloroglucinol, BAP and NAA Enhance Axillary Shoot Proliferation and other Growth Indicators *in vitro* Culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.)//Advances in Environmental Biology. — 2012. — 6(7). — P. 1944–1949.

Надійшла 2.10.2015.