

УДК 581.13 : 678.746.4 : 582.746.56

ДИНАМІКА ВМІСТУ ПОЛІФЕНОЛІВ У ЛИСТКАХ РОСЛИН ГІРКОКАШТАНА ЗВИЧАЙНОГО (*Aesculus hippocastanum* L.) ЗА УМОВ МЕХАНІЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ

О.С. Пентелюк, аспірантка*

А.Ф. Ліханов, кандидат біологічних наук

І.П. Григорюк, член-кореспондент НАН України

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено динаміку вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у листках гіркокаштана звичайного. Показано вплив цих сполук на здатність рослин до протидії ураженню каштановою мінуючою мілью.

Вступ. Рослини гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) постійно знаходяться під впливом водного дефіциту, низької і високої температур, затінення, нестачі чи надлишку мінеральних речовин [1], засолення, інтенсивної інсоляції [2], ураження патогенними організмами й фітофагами [3] та техногенного навантаження. В умовах стресу в рослинному організмі посилюється інтенсивність дихання і пов'язані з ним окисно-відновні процеси, що супроводжуються утворенням активних форм кисню і вільних радикалів, які зумовлюють перекисне окиснення ліпідів. На фоні загального зменшення пулу антиоксидантів, які нейтралізують негативну дію вільних радикалів, порушується баланс прооксидантно-антиоксидантної рівноваги [4].

Наслідки оксидативного стресу знешкоджуються неферментативною ланкою антиоксидантної системи, до якої

належать фенольні сполуки (флавоноїди, таніни, оксикоричні кислоти) [5], що виконують захисну функцію за умов інфікування рослин, індукують утворення хімічних і тканинних бар'єрів та підсилюють процеси відновлення клітин. Поліфеноли відзначаються ідеальною хімічною будовою для нейтралізації кисневих радикалів. Як високоактивні донори і акцептори протонів й електронів, вони стабілізують вільні радикали та беруть участь у хелатуванні іонів перехідних металів (реакція Фентона). Флавоноїди здатні знижувати кінетичну енергію реакції перекисного окиснення ліпідів та регулювати плинність клітинних мембран.

Рослини гіркокаштана звичайного синтезують у вегетативних і генеративних органах значну кількість фенолів, необхідних для формування систем стійкості. Антиоксидантну активність його насіння пов'язують з високим вмістом

*Науковий керівник – член-кореспондент НАН України І.П. Григорюк.

флавоноїдів, зокрема глікозидів і ацильованих форм кверцетину та кемпферолу [6,7]. У листках рослин близьких таксонів – гіркокаштана дрібноквіткового (*Aesculus parviflora* Walt.) і гіркокаштана гладколистого або голого (*Aesculus glabra* Willd.) виявлено 28 фенольних сполук, які належать до групи гідроксикоричних кислот, флаван-3-олів та флавонолів [8]. Високу концентрацію полімерних проціанідинів у листках рослин гіркокаштана дрібноквіткового, порівняно з гіркокаштаном гладколистим або голим, вважають причиною підвищеної стійкості їх проти каштанової мінуючої молі (КММ) (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic) [9,10]. Стійкість рослин гіркокаштана м'ясочервоного (*Aesculus carnea* Hayne) проти КММ також пояснюють підвищенням вмістом у листках поліфенольних сполук, зокрема, (-)-епікатехіну та проціанідинів [11,12]. Показано, що ураження листків комахами супроводжується зниженням кількості окремих фенольних сполук, у т. ч. флаван-3-олів. Міжвидові зв'язки КММ з рослинами гіркокаштана звичайного пов'язані з синтезом поліфенолів. Однак механізми їх стійкості проти фітофага ще остаточно не з'ясовані. Виходячи з цього, основною метою наших досліджень було вивчення динаміки вмісту фенольних сполук у листках стійких і нестійких рослин гіркокаштана звичайного за умов їх механічного пошкодження.

Об'єкти і методи досліджень.

Дослідження проводили на рослинах гіркокаштана звичайного селітебних насаджень Києва. Відбір стійких проти КММ рослин здійснювали за результатами моніторингових досліджень 2010–2015 рр. Листки для фітохімічних аналізів відбирали з нижнього ярусу (1,8–2,0 м) генеративних дерев віком 25–30 років до появи перших ознак пошкоджень асиміляційної поверхні КММ.

Для моделювання стресових реакцій на пошкодження листків нестійких і стійких проти КММ рослин гіркокаштана звичайного з листочків відрізали верхівки за схемою (рис. 1). Далі протягом 5 год по зрізаних краях листових пластинок щогодини послідовно відрізали вузькі смужки шириною 3–4 мм, у яких темпорально визначали кількість фенольних сполук і флавоноїдів.

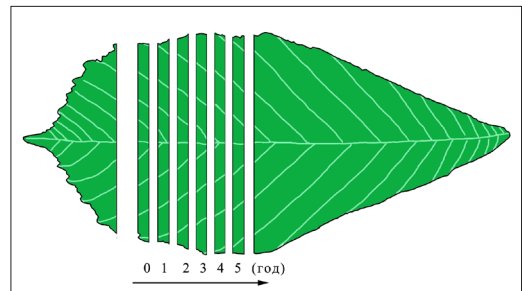


Рис. 1. Схема темпорального пошкодження листової пластинки рослин гіркокаштана звичайного

Сумарну концентрацію фенольних сполук у метанольних екстрактах ($v/v - 1/10$) листків рослин досліджували на сканувальному спектрофотометрі "Optizen Pop" (Південна Корея) з використанням реактиву Фоліна-Чекольтеу [13]. Калібрувальний графік будували за галовою кислотою. Кількісний вміст флавоноїдів визначали у метанольних екстрактах за $\lambda = 419$ нм. До 300 мкл екстракту послідовно додавали 200 мкл 0,1М розчину хлориду алюмінію ($AlCl_3$) і 300 мкл 1М ацетату натрію (CH_3COONa). Як стандарт використовували кверцетин (Sigma, Germany) [14]. Повторність фітохімічних досліджень – 5-кратна. Регресійний аналіз динаміки вмісту фенольних сполук і флавоноїдів у листках рослин виконували за допомогою програми Sigma Plot 12.0.

Результати досліджень. У процесі інвентаризації міських насаджень Києва нами виявлено поодинокі дерева гіркокаштана звичайного, які повністю стійкі

проти КММ. На фоні тотального uszkodження листків більшості дерев цілісність асиміляційної поверхні у них зберігалася до кінця вегетаційного періоду. Високим рівнем стійкості проти КММ відзначалися також рослини гіркогоаштана гібридного (*Aesculus hybrida* D.C.), гіркогоаштана м'ясочервоного (*Aesculus carnea* Haune.), гіркогоаштана червоного або павії (*Aesculus pavia* L.), гіркогоаштана восьмилисточкового або жовтого (*Aesculus octandra* March.), що узгоджується з даними інших дослідників [8]. Водночас, в поодиноких випадках міні фіксували і на листках достатньо стійких проти КММ видів гіркогоаштана. Даний факт свідчить про складність системи взаємодії рослина-фітофаг і принципову неможливість повного знищення КММ в умовах мегаполіса. За нестачі кормової бази відбувається перехід на інші види рослин, зокрема клен гостролистий (*Acer platanoides* L.) та клен явір (*Acer pseudoplatanus* L.) [15,16], які також належать до родини *Sapindaceae* Juss. Окремі випадки переходу КММ на інші деревні види рослин в умовах високотемпературного стресу підтверджено результатами наших спостережень.

На тканинному рівні пошкодження листків гусеницями КММ супроводжувалось поступовим накопиченням у клітинах мезофілу листків специфічних базофільних сполук, які визначались гістохімічним методом. На пізніх етапах росту і розвитку гусениць КММ ротовий апарат може розривати клітинні стінки, внаслідок чого прискорюється процес поглинання тканин і швидкість вивільнення з вакуолей глікозидованих фенольних сполук, які під дією ферментів оксидазного стресу швидко окиснюються.

За сприятливих умов зростання листки гіркогоаштана звичайного накопичують таніни, більшість з яких представлена проантоціанідинами з високою молекулярною масою і значним антиоксидантним потенціалом. Даний клас сполук здат-

ний зв'язуватись з ферментами, порушувати конформацію білків і ускладнювати перетравлювання проантоціанідинів у середньому відділі кишкового личинок комах, що надійно захищає листки від пошкоджень фітофагами. Зрештою, травна система гусениць КММ може долати подібні фітохімічні бар'єри і засвоювати високоенергетичні фенольні сполуки. Отже, відкритим залишається питання щодо формування фітохімічних і молекулярних механізмів стійкості представників даного виду рослин проти КММ.

Біологію стійкості рослин проти фітофагів актуально розглядати в умовах моделювання їх реакцій на травматичні стреси. Необхідно враховувати, що порушення цілісності клітин листків ротовим апаратом гусениць суттєво змінює процеси метаболізму у прилеглих тканинах. Результати біохімічного аналізу механічно пошкоджених листків показали, що у нестійких проти КММ рослин гіркогоаштана звичайного загальний пул фенольних сполук був майже вдвічі більший ніж у стійких (рис. 2).

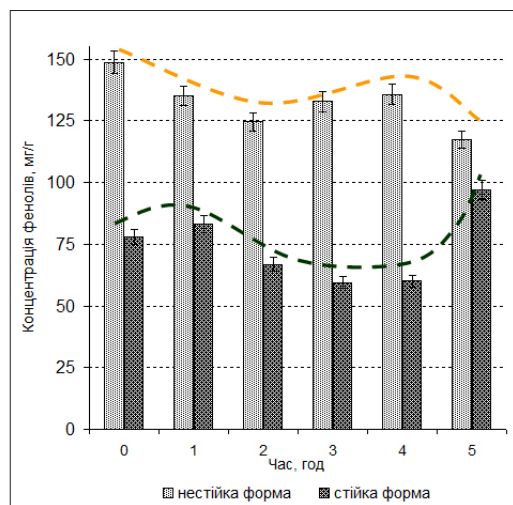


Рис. 2. Динаміка вмісту фенольних сполук у листках гіркогоаштана звичайного за умов механічного пошкодження листової пластинки

Встановлено, що у листках нестійких проти КММ рослин гіркокаштана звичайного у перші 2 год після травматичного стресу кількість фенолів зменшувалась з 150 до 130 мг/г. Разом з цим, у тканинах листків прослідковувалася тенденція поступового збільшення концентрації сумарних фенолів, а наприкінці експерименту – незначне зменшення. У стійких проти КММ рослин також виявлено коливальний характер зміни рівня фенольних сполук. За різким, але нетривалим збільшенням, вміст поліфенолів поступово зменшувався, а через 5 год після початку експерименту знову простежувалось стрибкоподібне збільшення їх кількості (рис. 2). Динаміка коливання концентрації вторинних метаболітів у листках стійких проти КММ рослин гіркокаштана звичайного знаходилась у протифазі з нестійкими, тобто була дзеркально протилежною.

Виявлений нами феномен пов'язаний, ймовірно, з особливостями перебудови метаболізму рослин, активацією синтезу та конденсацією флаван-3-олів з наступним утворенням проантоціанідинів. На молекулярному рівні порівняльну оцінку стресових реакцій листків нестійких і стійких проти КММ рослин зручно проводити за допомогою розробленої нами математичної моделі, яка дозволяє аналізувати закономірності функціонування фізіологічних процесів, виділяти окремі фази реакції рослин, їх тривалість та інтенсивність. Доведено, що за умов порушення цілісності тканин у листках гіркокаштанів відбувається складний за динамікою процес накопичення флавоноїдів, який описується таким логнормальним рівнянням:

$$y = y_0 + \frac{a}{x} \cdot \exp \left(-0,5 \cdot \left(\frac{h \cdot \frac{x}{x_0}}{b} \right)^2 \right),$$

де y_0 – фонова концентрація флавоноїдів у тканинах листка;

a, b – емпірично визначені коефіцієнти, з яких перший визначає рівень насиченості біосистеми продуктами халконсинтазного шляху синтезу, другий – інтенсивність нагромадження та трансформації флавоноїдів;

x_0 ($x_0 \neq 0$) – час, який характеризує швидкість відгуку біосистеми на зовнішні стимули і є показником інерційності біосистеми;

x – час тривалості реакції на стрес.

Точність опису емпіричних даних рівняннями достатня ($R^2 > 0,97$) для використання їх як функціональної моделі дослідження процесів халконсинтазного шляху синтезу речовин у тканинах листків нестійких і стійких проти КММ рослин гіркокаштана звичайного. Визначені коефіцієнти рівнянь дозволяють достовірно оцінити динаміку фітохімічних процесів (табл.). Так, у стійкої форми коефіцієнт b був меншим в 1,77 разів, що характеризує фоновий антистресовий і антиоксидантний потенціали рослини.

Встановлено, що у листках рослин гіркокаштанів, стійких проти КММ, сумарний вміст флавоноїдів у 3,6–3,7 разів більший ніж у нестійких. На початкових етапах стресу, після механічного пошкодження, суттєвих відмінностей у вмісті флавоноїдів у тканинах листків рослин гіркокаштана не встановлено (рис. 3).

Стає очевидним, що для біосинтезу флавоноїдів у тканинах використовуються запаси фенілпропанолів, які в листках нестійких проти КММ рослин містяться в значно більшій кількості (див. рис. 2).

Фізіологічна реакція за даним показником починалася через 0,5–0,7 год після травмування рослин. Для стійких рослин період пролонгації відповідної реакції на стрес (I) був удвічі тривалішим і становив 1–1,3 год. Сумарний вміст флавоноїдів у нестійких проти КММ рослин гірко-

Таблиця. Показники і коефіцієнти логнормального рівняння, які описують динаміку вмісту флавоноїдів у листках рослин гіркокаштана звичайного

Форми	a	b	x_0	y_0	R^2
Нестійкі (Н)	13,4822	0,4488	3,1268	1,0549	0,979
Стійкі (С)	9,4703	0,2531	3,0912	4,4230	0,991
Відношення Н/С	1,42	1,77	1,01	0,24	-

каштана звичайного за 5 год збільшувався в 5,5–6 разів. У стійких рослин цей процес протікав значно повільніше і загальна кількість флавоноїдів, порівняно з фоновим значенням, зростала лише у 1,5–1,7 разів. У посттравматичний період (2,5–3 год) їх кількість дещо вирівнювалась і становила 5,0–5,6 мг/г у нестійких рослин і 7,2–7,5 мг/г – у стійких. В останніх різниця у концентрації флавоноїдів на початковому і завершальному етапах експерименту (ΔC^c) була незначною. Вона знаходилася у межах статистичної похибки і не перевищувала 0,05–0,1 мг/г, водночас у нестійких рослин цей показник (ΔC^H) складав 1,0–1,6 мг/г сирової маси, що удвічі більше за фонове значення. Відміни у вмісті флавоноїдів на момент завершення експерименту між нестійкими і стійкими проти КММ рослинами скорочувались в 1,6 рази.

Очевидно, що реакційна здатність нестійких проти КММ рослин у відповідь на пошкодження тканин листків є значно вищою (рис. 4). У математичній моделі саме коефіцієнти x_0 і b визначають тривалість періоду пролонгації й швидкість досягнення максимальної концентрації флавоноїдів. Зниження їхньої концентрації у перші дві години експерименту показало, що частина з них є лабільною, швидко трансформується і переходить у зв'язану форму та/або полімеризується. Зокрема, в клітинних стінках відбувається зміцнення лінійних молекул целюлози диферуловими містками, посилюються процеси утворення лігніну, суберину тощо. В аспекті відповідної фізіологічної перебудови рослин актуальним є з'ясування специфіки трансформації флавоноїдів у завершальний період первинної стресової реакції рослинного організму.

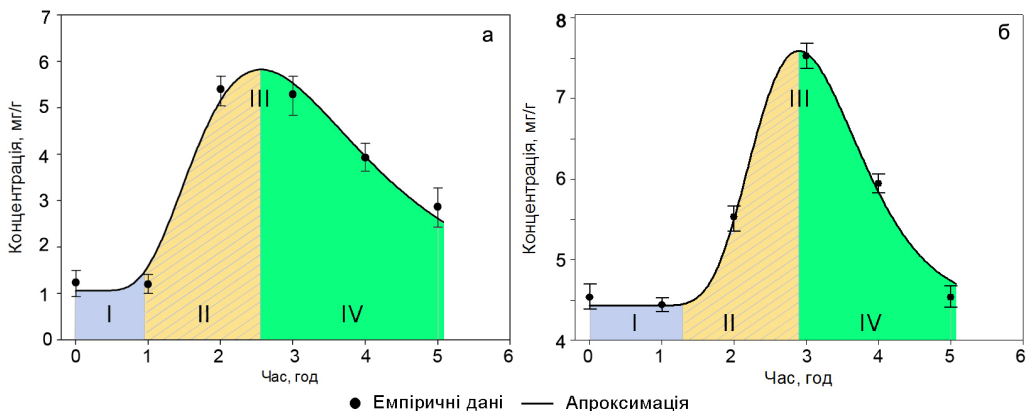


Рис. 3. Динаміка вмісту флавоноїдів у листках нестійких (а) і стійких (б) проти КММ форм гіркокаштана звичайного. Періоди: I – пролонгації, II – активного синтезу, III – насичення, IV – біохімічної трансформації

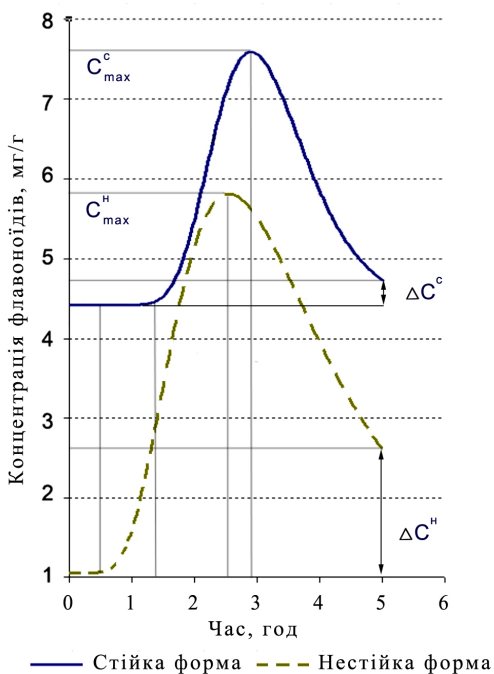


Рис. 4. Математична модель динаміки вмісту флавоноїдів у листках стійких і нестійких проти КММ форм гіркокаштана звичайного за умов їх механічного пошкодження: ΔC^C і ΔC^H – різниця вмісту флавоноїдів на початок і завершення експерименту; C_{\max}^C і C_{\max}^H – максимальна концентрація флавоноїдів у стійких та нестійких проти КММ рослин

Одним з можливих шляхів даного процесу є полімеризація флаван-3-олів, зокрема (-)-епікатехінів та (+)-катехінів з утворенням проантоціанідинів, які у значних кількостях містяться у листках гіркокаштанів. Крім того, за умов інтенсивного дихання клітин, яке супроводжується синтезом супероксид аніон радикалу і його дисмутації до перекису водню, активізуються реакції окиснення флавоноїдів, зокрема катехольної групи гідроксилів флавонів і флавонолів у 3' і 4' положеннях бензольного кільця В.

Висока концентрація флавоноїдів у листках стійких проти КММ рослин, на

фоні значно меншого вмісту фенілпропаноїдів і конденсованих танінів означає, що захисні реакції рослин мають іншу природу, ніж вважають на сьогодні.

Нашими дослідженнями підтверджено факт, що в екстрактах листків нестійких проти КММ рослин гіркокаштана звичайного, порівняно зі стійкими, міститься незначна кількість кверцетин-3-О-рутинозиду (рутину). Даний флавоноїд є одним з найактивніших рослинних антиоксидантів, який, залежно від концентрації, здатний впливати на харчову поведінку комах і виконувати роль атрактанта або репелента [15].

Враховуючи той факт, що стійкі проти КММ рослини гіркокаштана звичайного відзначаються високим вмістом флавоноїдів і низьким проантоціанідинів, а також численні повідомлення щодо ураження КММ інших видів рослин, зокрема клена гостролистого і клена-явора [16–18], для яких характерним є накопичення конденсованих танінів, виникають сумніви щодо ключової ролі проантоціанідинів та катехінів у формуванні системи захисту гіркокаштанів від КММ. Крім того, є підстави вважати, що вони є одними з найважливіших еволюційно закріплених біохімічних сполук, які обумовили високоспеціалізовані міжвидові відносини в системі рослина-фітофаг. Розвинуто уявлення щодо ролі флавоноїдів, як компонентів захисної системи рослин роду *Aesculus* L. від пошкодження КММ.

Висновки

У листках рослин гіркокаштана звичайного, нестійких проти КММ, концентрація сумарних фенольних сполук в 1,5–2,0 рази вища ніж у стійких, а флавоноїдів, навпаки, – у 3,5–4,0 рази нижча.

Механічне пошкодження листків активує синтез флавоноїдів протягом 2–3 год, а після нетривалого періоду максимально-



го нагромадження їх вміст зменшується через залучення флавоноїдів у складний процес захисту клітинних структур від вільних радикалів і потенційних патогенів та шкідників. В умовах стресу різниця в концентрації флавоноїдів між стійкими і нестійкими проти КММ рослинами гіркокаштана звичайного знижувалась майже у 2 рази.

Динаміку вмісту флавоноїдів, як фізіологічну реакцію рослин на механічні пошкодження, описано функцією логнормальної залежності. На підставі математичної моделі визначено чотири періоди нагромадження поліфенолів у листках рослин гіркокаштана звичайного – пролонгації, активного синтезу, насичення і біохімічної трансформації.

Література

- Mittler R., Blumwald E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives // *Annu. rev. plant biol.* – 2010. – **61**. – P. 443–462.
- Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / A. Gür, U. Demirel, M. Özden et al. // *African J. of biotech.* – 2010. – **9**, № 7. – P. 1008–1015.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstet K. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // *Annals of botany.* – 2003. – **91**. – P. 179–194.
- Hung S.-H., Yu C.-W., Lin C.-H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // *Bot. bull. acad. sin.* – 2005. – **46**. – P. 1–10.
- Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // *Вісник ХНАУ ім. В.В. Докучаєва: Серія біол.* – 2007. – **12**, № 3. – С. 6–26.
- Dudek-Makusch M., Matlawska I. Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum* // *Acta Polonica Pharmacologica – Drug Research.* – 2011. – **68**, №.3. – P. 403–408.
- Kapusta I., Janda B., Szajwaj B. Flavonoids in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) seeds and powdered waste water byproducts // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – **55**. – P. 8485–8490.
- Oszmianski J., Kolniak-Ostek J., Biernat A. The content of phenolic compounds in leaf tissues of *Aesculus glabra* and *Aesculus parviflora* Walt // *Molecules.* – 2015. – **20**. – P. 2176–2189.
- Григорюк І.П., Лук'яненко Т.Л. Фізіологічні і молекулярні основи стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої моті: Монографія. – К.: ЦП «Компринт», 2015. – 174 с.
- Каштановая минирующая моль в Украине / М.Д. Зерова, Г.Н. Никитенко, Н.Б. Нарольський и др. // – К.: ТОВ «Вереc», 2007. – 87 с.
- Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family / G. Dabrowska, A. Kata, A. Goc et al. // *Acta biologica cracoviensia: Series Botanica.* – 2007. – **49**, № 1. – P. 7–17.
- Oszmianski J., Kalisz S., Aneta W. The content of phenolic compounds in leaf tissues of white (*Aesculus hippocastanum* L.) and red horse chestnut (*Aesculus carnea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic) // *Molecules.* – 2014. – **19**. – P. 14625–14636.
- Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений / Г.В. Сибгатуллина, Л.Р. Хаертдинова, Е.А. Гумерова и др. – Казань: Приволжский Федеральный университет, 2011. – 61 с.
- Практикум по фармакогнозии / В.Н. Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко и др. / Под ред. В.Н. Ковалева. – Х.: Изд-во НФаУ «Золотые страницы», 2003. – 512 с.
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // *Molecules.* – 2014. – **19**. – P. 16240–16265.
- Straw N., Tilbury C. Host plants of the horse-chestnut leaf-miner (*Cameraria ohridella*), and the rapid spread of the moth in the UK 2002–2005 // *Arboricultural J.* – 2006 – **29**. – P. 83–90.
- Трибель С.М., Гаманова О.М., Свентославські Я. Каштанова мінуюча міль. – К.: Колобір, 2008. – 72 с.

18. The invasive alien leaf miner *Cameraria ohridella* and native tree *Acer pseudoplatanus*: a fatal attraction? / C. Peret, S. Augustin, T. Turlingst, M. Kenls // *Agricultural and Forest Entomology*. – 2010 – 12. – P. 151–159.

SUMMARY

O. Penteliuk, A. Likhanov, I. Hrygoriuk.
*Dynamics of polyphenols in the leaves of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) plants in the condition of mechanical damage // *Biological Resources and Nature Management*. – 2016. – 8, №1–2. – P.3–12.*

*The dynamics of phenolic compounds content and flavonoids in the leaves of *Aesculus hippocastanum* L. is investigated. The compounds effect by the plants ability to be counteract of chestnut miner moth is shown.*

АННОТАЦІЯ

Пентелюк О.С., Ліханов А.Ф., Григорюк І.А.
*Динамика содержания полифенолов в листьях растений каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) в условиях механических повреждений // *Биоресурсы и природопользование*. – 2016. – 8, №1–2. – С.3–12.*

*Изучена динамика содержания фенольных соединений и флавоноидов в листьях *Aesculus hippocastanum* L. Показано влияние этих соединений на способность растений противодействовать поражению каштановой минирующей молью.*