

УДК 581.13 : 678.746.4 : 582.746.56

# ПРОСТОРОВА СПЕЦИФІЧНІСТЬ НАГРОМАДЖЕННЯ ФЕНОЛІВ У ЛИСТКАХ РОСЛИН ГІРКОКАШТАНА ЗВИЧАЙНОГО (*Aesculus hippocastanum* L.)

А.Ф. Ліханов, кандидат біологічних наук

О.С. Пентелюк, аспірантка\*

І.П. Григорюк, член-кореспондент НАН України

С.М. Костенко, кандидат сільськогосподарських наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

З'ясовано, що нагромадження фенольних сполук у листках має значну ярусну мінливість. Виявлено найбільший вміст фенолів у метамерах верхніх ярусів дерев. Показано кореляцію між ярусним розташуванням листків у кроні та кількістю в них катехінів.

**Вступ.** Деревні види рослин з масивними кронами просторова гетерогенні. Ярусну мінливість мікроморфології метамерів уперше показав В.Р. Заленський [1], який довів, що листки верхніх ярусів рослин через гостру нестачу вологи і високу інсоляцію набувають ксероморфних ознак. Серед них виділяють формування товстої кутикули, зменшення розмірів і збільшення кількості продихів на одиницю листової поверхні та товщини листової пластинки. Морфогенез рослин регулюється гормональними стимулами. Полярний транспорт фітогормонів відбувається за участю спеціальних білків і контролюється вторинними метаболітами, в т. ч. флавоноїдами та іншими фенольними сполуками [2, 3]. Так, флавоноли, кверцетин і кемпферол беруть участь у функціонуванні спеціальних транспортних білків, які забезпечу-

ють полярний перенос ауксинів [3]. Експресія генів, котрі відповідають за синтез антоціанів і інших фенолів у листках, залежить від інтенсивності сонячного освітлення [4]. Фотоактивні сполуки накопичуються в епідермісі і виконують роль фітохімічного екрана, який захищає клітини мезофілу у хлоропласти від надлишкової інсоляції [4]. Дефіцит вологи у верхніх ярусах крони компенсується зменшенням розмірів клітин і товщиною клітинних стінок рослин. Форма і розміри клітин також залежать від швидкості включення фенолів, зокрема оксикоричних кислот, у структури клітинних стінок рослин. Фенольні сполуки виконують різноманітні функції у формуванні системної стійкості рослин проти несприятливих чинників [5, 6]. Для гіркокаштану звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) даний аспект досліджен-

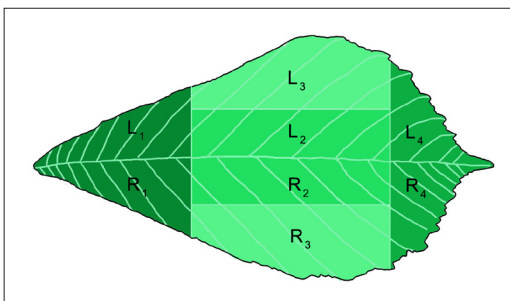
\*Науковий керівник – професор І.П. Григорюк.

ня має особливе значення у зв'язку з поширеною думкою щодо ключової ролі фенолів у формуванні показників стійкості рослин проти каштанової мінуючої молі (КММ) [7, 8].

Метою дослідження було визначення ярусної і просторової мінливості нагромадження фенольних сполук у листках генеративних дерев гіркогокаштана звичайного.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили на рослинах гіркогокаштана звичайного селітебних насаджень Києва. Листки для фітохімічних експериментів відбирали з урахуванням ярусів дерев на висоті від 2,0 до 9,0 м до появи перших ознак ушкоджень асиміляційної поверхні КММ. Фенольні сполуки в листочках пальчастоскладного листка визначали за схемою, зображеною на рис. 1.

Сумарну концентрацію фенольних сполук у метанольних екстрактах ( $v/v - 1/10$ ) досліджували на сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop (Південна Корея) з використанням реактиву Фоліна-Чекольтеу [9]. Калібрувальний графік будували за галовою кислотою. Кількісний уміст флавоноїдів визначали у метанольних екстрактах за  $\lambda = 419$  нм. До 300 мкл



**Рис. 1.** Схема секторальної розмітки центрального листочка пальчастоскладного листка гіркогокаштана звичайного для фітохімічного аналізу тканин частин пластинки:  $L_1, R_1$  – базальна,  $L_2, R_2$  – медіально-проксимальна,  $L_3, R_3$  – медіально-латеральна  $L_4, R_4$  – апікальна

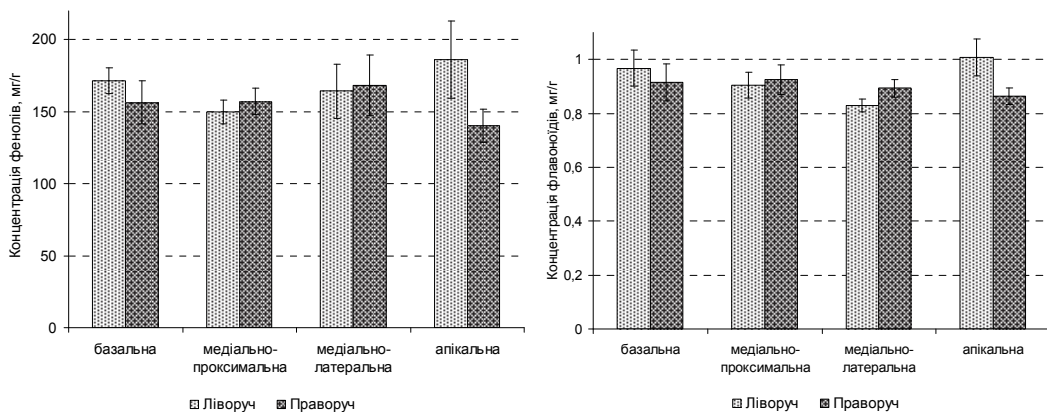
екстракту послідовно додавали 200 мкл 0,1 М розчину хлориду алюмінію ( $AlCl_3$ ) і 300 мкл 1М ацетату натрію ( $CH_3COONa$ ) [10]. Як стандарт використовували кверцетин (Sigma, Germany).

Вміст катехінів визначали за їх реакцією на ваніліновий реактив. До 100 мкл екстракту поступово додавали 900 мкл метанолу, 2,5 мл 1 % розчину ваніліну та 2,5 мл 9 н  $H_2SO_4$  у метанолі. Визначення оптичної густини (D) реакційної суміші проводили через 30 хв за  $\lambda = 500$  нм [11]. Повторність фітохімічних досліджень – 5-кратна.

Якісний аналіз фенольних сполук проводили методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) на платівках Merck (Silicagel G 60) у системі розчинників толуол-ацетон-мурашина кислота ( $v/v/v - 7/7/1$ ) з подальшою обробкою хроматограми 5 % спиртовим розчином хлориду алюмінію і наступним нагріванням (5 хв за  $105^\circ C$ ).

Показники  $R_f$  індивідуальних сполук встановлювали фотоденситометрично з використанням комп'ютерної програми Sorbfil TLC. Первинну статистичну обробку даних виконували в пакеті аналізу програми Microsoft Excel 2007. Регресійний і кореляційний аналізи динаміки вмісту фенольних сполук проводили за допомогою програми Sigma Plot 12.0.

**Результати досліджень та їх обговорення.** За сприятливих умов зростання листки гіркогокаштана звичайного накопичують катехіни і конденсовані таніни, переважна більшість з яких є проантоціанідинами з високою молекулярною масою та значним антиоксидантним потенціалом. Дослідження специфіки просторового розподілу фенольних сполук у тканинах листочків складного листка показали, що їх концентрація у базальній і проксимальній



**Рис. 2. Просторовий розподіл фенольних сполук і флавоноїдів у листочках складного листка гіркокаштану звичайного**

частинах пластинки є відносно рівномірною (рис. 2). Найвища (29 %) варіабельність нагромадження фенолів спостерігалась в апікальній частині листкової пластинки. Ця особливість свідчить про фізіологічну пластичність і чутливість апікальної та латеральної зон листка до впливу стресових чинників. Просторовий розподіл флавоноїдів у тканинах листочків, у цілому, співвідноситься з нагромадженням сумарних фенольних сполук.

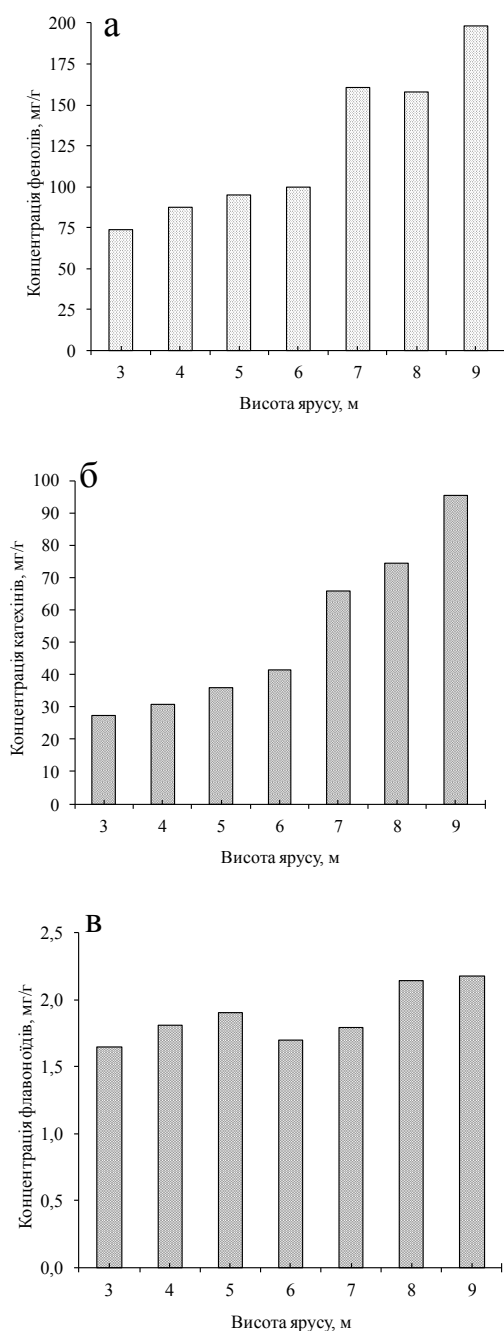
Виявлений нами відносно стабільний вміст фенолів у тканинах медіально-проксимальної зони листкових пластинок дозволяє використовувати їх для релевантного фітохімічного аналізу фенольних компонентів. Дослідження ступеня нагромадження в листках гіркокаштану звичайного різних класів фенольних сполук залежно від їх просторового розташування у кроні дерев показало, що між висотою ярусу і кількістю загальних фенолів та катехінів існує пряма залежність (рис. 3, а, б).

Ярусна мінливість вмісту флавоноїдів була менш вираженою (рис. 3, в). Такий характер їх розподілу базується на фізіологічних властивостях флавоноїдів, які пов'язані з регуляторними і кон-

ституціональними функціями сполук даного класу.

Залежність від ярусу листка синтезу і накопичення катехінів та проантоціанідинів описується ступеневою функцією виду  $y = y_0 + a \cdot x^b$ . Для досліджених нами рослин рівняння мало вираз  $y = 22,4982 + 0,1719 \cdot x^{2,7579}$  (точність апроксимації  $R^2 \sim 0,982$ ). Отже, зміщення метаболізму в листках у бік нагромадження в тканинах проантоціанідинів має чітко виражену вертикальну просторову залежність, яка пов'язана з водним режимом і інтенсивністю освітлення асиміляційної поверхні.

Доведено, що фенольні сполуки (катехіни, антоціани, флавоноли) поглинають УФ-випромінювання і виконують фотопротекторну та антиоксидантну функції, які ґрунтуються на їх високому окисно-відновлювальному потенціалі [4]. Екофізіологічне значення накопичення катехінів (флаван-3-олів) і конденсованих танінів (проантоціанідинів) у листках рослин гіркокаштану звичайного має декілька аспектів. Збільшення інсоляції листків верхніх ярусів активізує процеси транспірації та фотосинтезу, що створює передумови для виникнення дефіциту  $CO_2$ ,



**Рис. 3.** Ярусна мінливість нагромадження пулу загальних фенолів (а), катехинів з проантоціанідинами (б) і флавоноїдів (в) у листках гіркогоаштана звичайного

який за підвищеної температури збільшується через зниження розчинності  $\text{CO}_2$  у воді. Нестача  $\text{CO}_2$  компенсується внутрішніми резервами рослинного організму через процеси фотодихання [1]. За умов окиснювання в пероксисомах гліколевої кислоти утворюється токсичний перекис водню, шкодочинна дія якого частково нейтралізується фенольними сполуками, у т. ч. епікатехінами. Повне окиснювання останніх супроводжується значним виділенням  $\text{CO}_2$  [4], що також зменшує його дефіцит у клітинах мезофілу рослин під час активного фотосинтезу.

Загальний стан рослинного організму характеризує кількісне і якісне співвідношення різних класів фенольних сполук у тканинах листків, які є динамічними показниками екологічно обумовленої спрямованості вторинного метаболізму. В наших дослідженнях виявлено обернений зв'язок між висотою ярусу рослин і відношенням вмісту в листках флавоноїдів до фенолів (табл. 1).

Аналогічну залежність встановлено щодо відношення нагромадження флавоноїдів до катехинів і проантоціанідинів. Взаємозв'язок вмісту останніх з накопиченням сумарних фенолів був, навпаки, прямим. Даний факт підтверджує ярусну залежність накопичення в листках катехинів й продуктів їх полімеризації, а також пов'язані з цим фізіологічні перебудови рослинного організму.

Методом ВЕГШХ нами показано поступове, пов'язане з ярусами, збільшення середньо- ( $R_f \sim 0,22$ ) і низькополярних ( $R_f \sim 0,40$  й  $0,45$ ) фенольних сполук з характерною блакитною флуоресценцією (рис. 4).

Ключовою ознакою функціональної ролі катехинів у формуванні систем стійкості рослин гіркогоаштана звичайного проти КММ може бути значне (в 12–15

**Таблиця 1. Ярусна залежність представленості окремих класів фенольних сполук у загальному пулі фенолів ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ), %**

| Висота ярусу, м         | Фл/Фн      | Кт/Фн       | (Фл+Кт)/Фн  | Фл/Кт      |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 3                       | 2,2 ± 0,11 | 37,1 ± 1,48 | 48,3 ± 1,93 | 5,9 ± 0,30 |
| 4                       | 2,1 ± 0,10 | 35,2 ± 1,41 | 45,6 ± 1,82 | 5,8 ± 0,29 |
| 5                       | 2,0 ± 0,10 | 37,8 ± 1,51 | 47,9 ± 1,92 | 5,3 ± 0,27 |
| 6                       | 1,7 ± 0,09 | 41,5 ± 1,66 | 50,1 ± 2,00 | 4,1 ± 0,21 |
| 7                       | 1,1 ± 0,05 | 41,0 ± 1,64 | 46,6 ± 1,86 | 2,7 ± 0,14 |
| 8                       | 1,3 ± 0,07 | 47,2 ± 1,89 | 53,9 ± 2,16 | 2,8 ± 0,14 |
| 9                       | 1,1 ± 0,06 | 48,2 ± 1,93 | 53,7 ± 2,15 | 2,3 ± 0,12 |
| Коефіцієнт кореляції, r | - 0,94*    | 0,94*       | 0,73        | - 0,96*    |

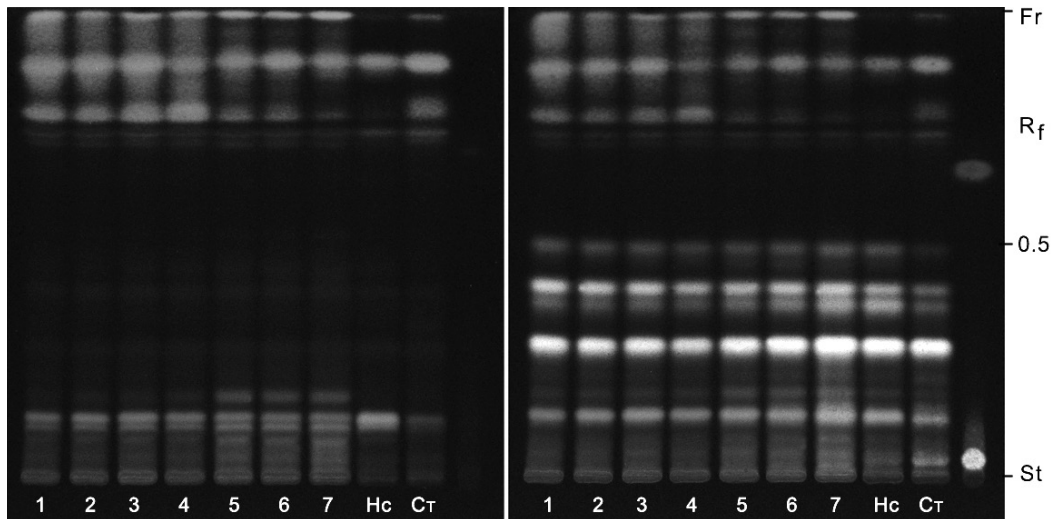
\* коефіцієнт є достовірним ( $P = 0,05$ );

Фн – феноли, Фл – флавоноїди; Кт – катехіни і проантоціанідини.

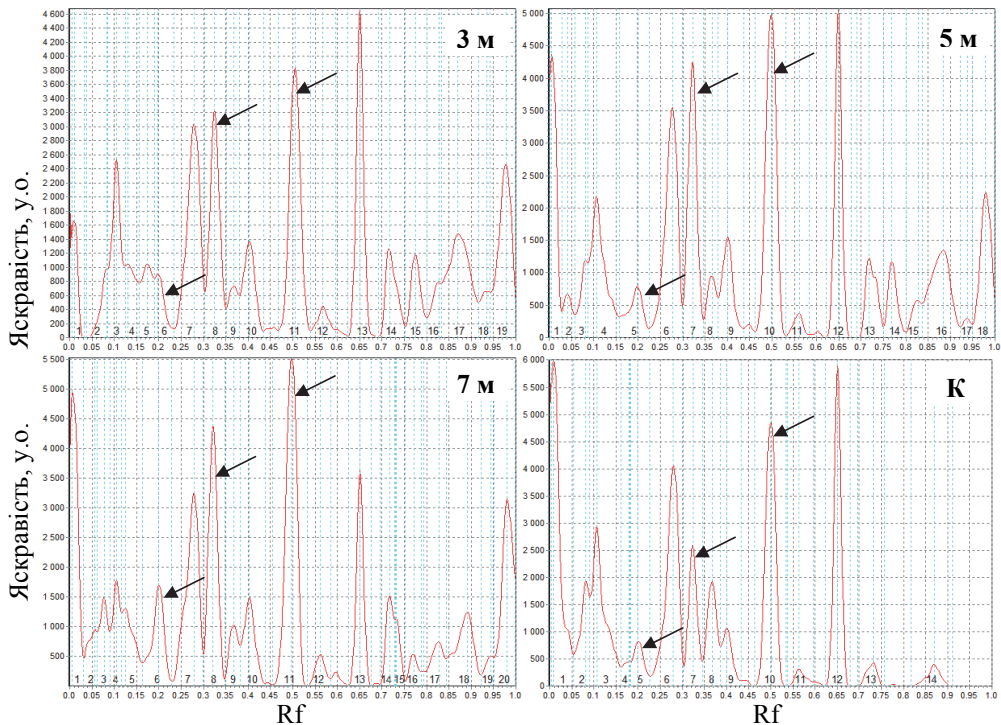
разів) зниження в листках загального пулу фенольних сполук. У наших експериментах переважна більшість стійких форм мала низький рівень накопичення катехінів і проантоціанідинів. Отже, цей клас сполук не є основою у забезпеченні надійного захисту від КММ. Якісний аналіз катехінів також не виявив накопичення специфічних окре-

мих фенольних сполук у стійких рослин. Фотоденситометричний аналіз хроматограм показав, що в нестійких проти КММ рослин вміст катехінів з  $R_f \sim 0,01$  і  $0,50$  по відношенню до стійких був у 2–3 рази меншим (рис. 5 і 6).

Коефіцієнти кореляції між накопиченням у листках індивідуальних флаван-3-олів і висотою ярусу коливались у межах



**Рис. 4. Хроматографічне розділення фенольних сполук метанольних екстрактів листків різних ярусів дерев гіркогоштанна звичайного: 1–7 – зразки листків з ярусів від 3 до 9 м; Hc – форма, яка нестійка проти КММ; St – форма, яка стійка проти КММ; стандарти – рутин і протокатехова кислота; до (ліворуч) і після (праворуч) обробки хроматограми 5 % спиртовим розчином  $AlCl_3$**



**Рис. 5.** Фотоденситограми хроматографічного розділення катехінів і проантоціанідинів листків різних ярусів дерев гіркокаштана звичайного (стрілками позначено піки, що відповідають катехінам)

0,84–0,90, що підтверджує загальну тенденцію до просторово-вертикальної залежності синтезу та нагромадження сполук даного класу.

Отже, генеративні дерева гіркокаштана звичайного за ступенем синтезу і розподілом кількості фенольних сполук (перш за все, проантоціанідинів) є просторово гетерогенною системою з вираженим вертикальним градієнтом. Крону дерева схематично можна поділити на три зони: нижню (I) – з низьким (20–40 мг/г), центральну (II) – з середнім (40–60 мг/г) і верхню (III) – з високим (60–100 мг/г) вмістом катехінів та проантоціанідинів (рис. 7).

Вертикальний градієнт розподілу різних класів фенольних сполук, у т. ч. фенілпропановидів, оксикоричних кис-

лот і їх кон'югатів, забезпечує гіркокаштану звичайному формування необхідних систем захисту та реалізацію адаптаційного потенціалу. Втім, еволюційно закріплені механізми пристосувальних реакцій в умовах міських екосистем не забезпечують цим рослинам достатньої стійкості проти КММ. Більш того, на нашу думку, саме проантоціанідини і катехіни гіркокаштана звичайного є ключовим ланцюгом трофічних взаємозв'язків у системі рослина–КММ. Травна система гусениць КММ здатна долати фітохімічні бар'єри листків і засвоювати високоенергетичні фенольні сполуки. З огляду на це, питання щодо ролі катехінів і інших фенолів у формуванні конституціональної й індукованої стійкості гіркокаштанів проти КММ залишається відкритим.

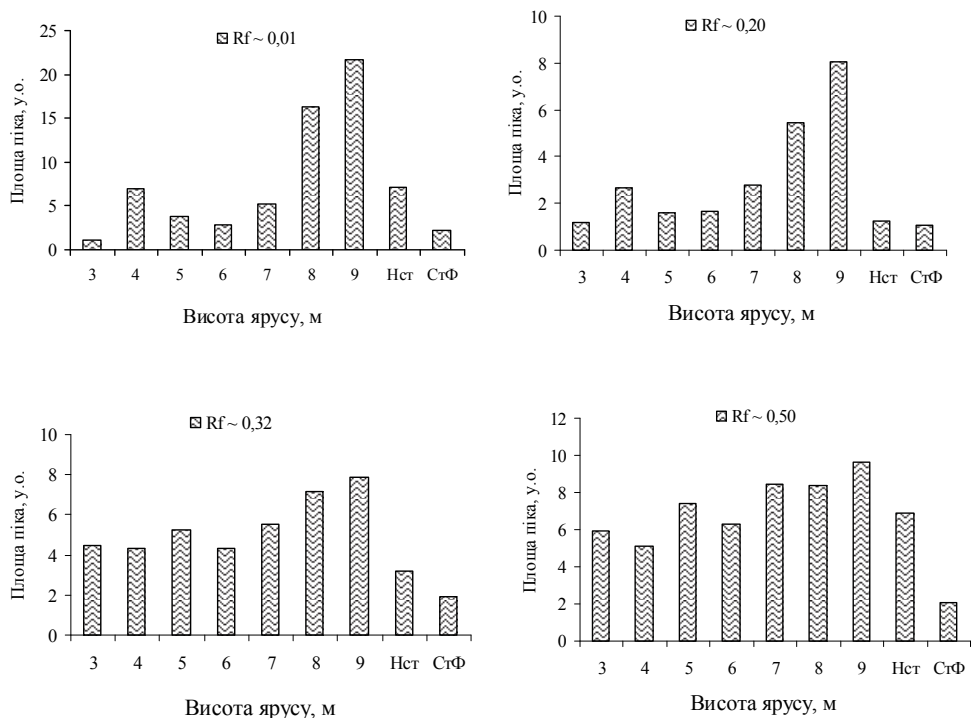


Рис. 6. Ярусна мінливість нагромадження у листках катехинів з різними показниками Rf на хроматограмі: Нст – нестійка і СтФ – стійка проти КММ форма гіркокаштана звичайного

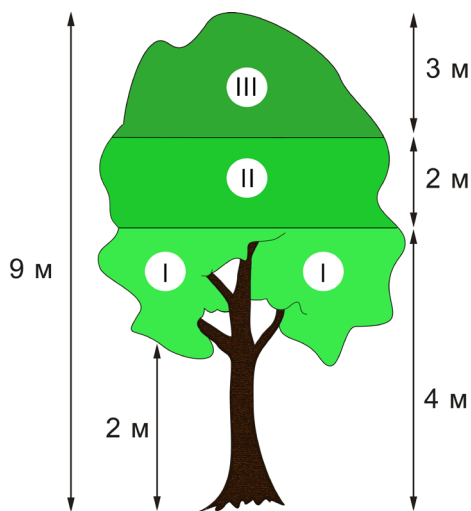


Рис. 7. Ярусність нагромадження катехинів і проантоціанідинів у листках гіркокаштана звичайного в умовах міських насаджень

### Висновки

У функціонально зрілих листках рослин гіркокаштана звичайного розподіл фенольних сполук, до ураження КММ, є рівномірним.

Нагромадження в рослинних тканинах фенольних сполук має виражену ярусну мінливість – найбільша їх кількість міститься в листках верхніх ярусів дерев.

Існує кореляція між ярусним розташуванням листків у кроні та кількістю катехинів.

Вміст катехинів і конденсованих танінів у листках рослин гіркокаштана звичайного, стійкого проти КММ, у 12–15 разів менший ніж у нестійкого.

Отримані результати ставлять під сумнів припущення щодо вирішальної ролі конденсованих танінів у формуванні систем фізіологічної стійкості рослин проти КММ.

## Література

1. Заленский В.Р. Материалы к количественной анатомии различных листьев одних и тех же растений // Изв. Киевск. политехн. ин-та. – 1904. – Т. IV. – Кн. 1. – 112 с.
2. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis / D.E. Brown, A.M. Rashotte et al. // Plant Physiol. – 2001. – 26(2). – P. 524–535.
3. Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses / D. Santelia, S. Henrichs, V. Vincenzetti et al. // The J. of Biological Chemistry. – 2008. – 283 (45). – P. 31218–31226.
4. Запрометов М. Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функция в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
5. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // Molecules. – 2014. – 19. – P. 240–265.
6. Oszmianski J., Ostek A., Kolniak J., Biernat The content of phenolic compounds in leaf tissues of *Aesculus glabra* and *Aesculus parviflora* Walt. // Molecules. – 2015. – 20. – P. 76–89.
7. Григорюк І.П., Лук'яненко Т.Л. Фізіологічні і молекулярні основи стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі. – К.: ЦП «Компринт», 2015. – 174 с.
8. 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. 625–636.
9. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений / Г.В. Сибгатуллина, Л.Р. Хаертдинова, Е.А. Гумерова и др. – Казань: Изд-во Казанского (Приволжского) Федерального университета, 2011. – 61 с.
10. 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.
11. Sun B., J.M. Ricardo-da-Silva, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins // J. Agric. Food Chem. – 1998. – 46. – P. 4267–4274.

## References

1. Zalenski, V.R. (1904). Materials for the quantitative anatomy of different leaves of the same plant. Proceedings of the Kiev Polytechnic Institute, 4(1), 112.
2. Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, I., Muday, G.K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis. Plant Physiology, 26(2), 524–535.
3. Santelia D., Henrichs S., Vincenzetti V., Sauer, M., Bigler, L., Klein, M., Bailly, A., Lee, Y., Frim, J., Geisler, M., Martinoia, E. (2008). Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. The Journal of Biological Chemistry, 283 (45), 31218–31226.
4. Zaprometov, M.N. (1993). Phenolic compounds. Distribution, metabolism and function in plants. Moscow: Nauka, 272 (in Russian).
5. Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules, 19, 240–265.
6. Oszmianski, J., Ostek, A., Kolniak, J., Biernat. (2015). The content of phenolic compounds in leaf tissues of *Aesculus glabra* and *Aesculus parviflora* Walt. Molecules, 20, 76–89.
7. Hryhoryuk, I.P., Lukyanenko, T.L. (2015). The physiological and molecular basis of plant resistance genus *Aesculus* L. against chestnut moth. Kyiv: TsP Komprynt, 174, (in Ukraine).
8. Oszmianski, J., Kalisz, S., Aneta, W. (2014). 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, 19, 625–636.
9. Sibgatullina, G.V., Haertdinova, L.R., Gumerova, E.A. (2011). Methods for determining the redox status of cultured plant cells. Kazan: Kazan Federal University, 61 (in Russian).
10. Kovalev, V.N., Popova, N.V., Kislichenko, V.S. (2003). Workshop on Pharmacognosy. Kharkiv: Zoloty stranytsy, 512 (in Ukraine).
11. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal Agricultural Food Chemistry, 46, 4267–4274.





SUMMARY

*A. Likhonov, O. Penteliuk, I. Grigoryuk, S. Kostenko. Spatial specificity taking phenols are in leaves of horse chestnut plants (*Aesculus hippocastanum* L.) // *Biological Resources and Nature Management*. – 2016. – 8, №3–4. – P. 5–13.*

*It was found that the accumulation of phenolic compounds in leaves has a strong tier variability. The highest phenol content meromes are defined in the upper tiers of trees. It is established a high correlation between the tiered arrangement of leaves in the crown and the number of them catechins.*

АННОТАЦІЯ

*Ліханов А.Ф., Пентелюк О.С., Григорюк І.А., Костенко С.М. Пространственная специфичность накопления фенолов в листьях растений каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) // *Биоресурсы и природопользование*. – 2016. – 8, №3–4. – С. 5–13.*

*Показано, что накопление фенольных соединений в листьях имеет выраженную ярусную изменчивость. Наибольшее содержание фенолов обнаружено в метамерах верхних ярусов деревьев. Установлена корреляция между ярусным расположением листьев в кроне и количеством в них катехинов.*