

УДК 581.44:582.711.712:631.526.3

**АНАТОМО-ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАГОНІВ
ПЕРСПЕКТИВНИХ СОРТІВ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ**

О. О. ОЛІЙНИК, аспірант*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

М. Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук, професор, академік НААН
України

Національна академія аграрних наук України

А. А. КЛЮВАДЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, старший
науковий співробітник

А. Ф. ЛІХАНОВ, кандидат біологічних наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: osa_solodar@ukr.net

***Анотація.** У статті наведено результати гістохімічного аналізу пагонів троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада та Радуга до введення в культуру *in vitro* та в культурі *in vitro*. Певними хімічними реакціями на зрізах пагонів виявлено локалізацію в тканинах крохмалю, М-лігніну, основних білків, поліфенолів та катехінів. Показано, що для успішної адаптації та регенерації експлантатів до умов *in vitro* доцільним є використання хімічних регуляторів, які здатні гальмувати процеси аутоінтоксикації живих тканин.*

***Ключові слова:** гістохімічний аналіз, троянда ефіроолійна, поліфеноли, крохмаль, білки, катехіни.*

Актуальність. В останні десятиліття важливими є біотехнологічні дослідження синтезу поліфенолів у рослинних експлантатах на етапі введення у культуру *in vitro* [7]. Троянда ефіроолійна належить до рослин, які у своєму складі містять велику кількість вторинних метаболітів. У листках рослин родини *Rosaceae* Juss. синтезуються біологічно активні сполуки фенольної природи: аглікони флавоноїдів – кемпферол і кверцетин та їх глікозиди,

* Науковий керівник – д-р біол. наук, проф., акад. НААН України М.Д. Мельничук

пірокатехін, пірогалол, еugenol, проціанідини, серед яких основним вважається епікатехін [3,9]. У молодих стеблах виявлено галову і ферулову кислоти, епікатехін, галатанін і димери проціанідинів. У тканинах здерев'янілих стебел накопичуються флавоон-3-ол(-)-епікатехін, мономери, димери і полімери проціанідинів [7]. Інтенсивний синтез вторинних метаболітів, який супроводжує травматичний стрес і забезпечує захист ушкоджених поверхонь від потенційно небезпечних патогенів [1], за умов їх надмірного нагромадження гальмує регенерацію тканин і створює передумови для незворотних деструктивних процесів і передчасної загибелі клітин [11], які призводять до втрати цінного рослинного матеріалу.

Мета дослідження – вивчення анатомічних особливостей пагонів перспективних сортів троянди ефіроолійної вітчизняної селекції Лань, Лада та Радуга для встановлення методів успішної адаптації експлантатів до умов *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Для досліджень використовувались живці троянд сортів Лань, Лада, Радуга (селекція Інституту ефіроолійних і лікарських рослин НААН) [5, 6] довжиною 20-30 см із пазушними бруньками, які були ізольовані із 2-річних рослин-донорів та пагони рослин-регенерантів із культури *in vitro*. Анатоомо-гістохімічний аналіз стебел проводили на поперечних зрізах другого міжвузля однорічних пагонів за використання мікроскопу Nikon Eclipse E-200. Структуру рослинних тканин вивчали на нативних препаратах завтовшки 20-30 мкм. Для виявлення катехінів у тканинах використовували 1 % ваніліновий реактив з 5 % соляною кислотою. Фенольні сполуки виявляли 5 % водним розчином хлориду заліза. Локалізацію основних білків визначали за Бонхегом у бромфонеловому синьому [8]. Відкладення М-лігніну визначали за перманганатною реакцією [2, 4].

Фотодокументацію матеріалів здійснювали за допомогою програми Camera Control Pro-2.

Результати досліджень та їх обговорення. Важливим критерієм визрівання тканин стебла є відкладення крохмалю у живих клітинах кори,

серцевинних променів і перимедулярної зони серцевинної паренхіми [10]. За результатами гістохімічного аналізу було з'ясовано, що запасний полісахарид найінтенсивніше накопичується в тканинах стебел сорту Лань. У рослин-регенерантів крохмаль виявлявся лише у клітинах первинної кори. Структурно тканини стебел рослин-регенерантів троянди мають ознаки ювенільності. Клітини кори ізодіаметричні, тонкостінні. Топологічно у первинній корі стебла виділяється екзокортекс, створений із декількох шарів клітин, мезокортекс, представлений крупними клітинами паренхіми та ендокортекс, до складу якого входять декілька шарів клітин. Екзокортекс закладається під епідермою стебла у вигляді багат шарового, зазвичай суцільного кільця, клітини якого з часом диференціюються у коленхіму пластинчастого типу (рис. 1).

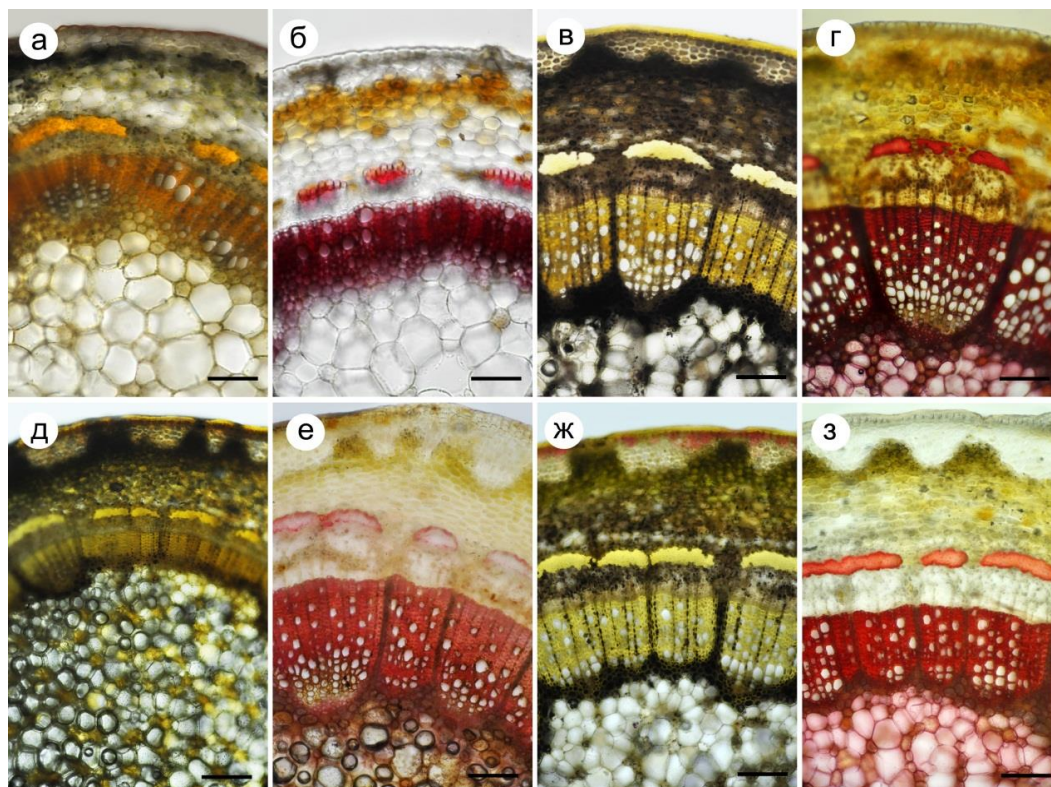


Рис. 1. Локалізація крохмалю (а, в, д, ж) і М-лігніну (б, г, е, з) в тканинах стебла троянди ефіроолійної: а-г – сорт Лань, д-е – сорт Лада; ж-з – сорт Радуга: а, б – рослина-регенерант сорту Лань в умовах *in vitro* (лінійка – 150 мкм)

Втім в умовах *in vitro* даний процес значно уповільнюється, що пов'язано із специфікою міксотрофного живлення і гормонального статусу рослин, на фоні якого гальмується формування вторинних клітинних стінок. Відповідно

пучки екстраксиллярних волокон також недостатньо розвинені. Вторинні клітинні стінки склеренхіми слабо здерев'янілі, хоча і мають незначні відкладення М-лігніну. Мезокортекс представлений крупними хлорофілоносними клітинами 30-50 мкм у діаметрі. В умовах *in vitro* у рослин зовнішнє коло клітин кори містить найбільший запас крохмалю. Резервні запасні полісахариди забезпечують енергетичні потреби рослини для процесів синтезу фенольних сполук, зокрема епікатехінів, які у значній кількості накопичуються саме в цій зоні. Локалізація білків (за реакцією на бромфеноловий синій) просторово пов'язана з зосередженням основної маси катехінів та інших поліфенольних сполук, у тому числі оксибензойних і оксикоричних кислот, танінів (рис. 2, б,е). Вважається, що локалізація значних кількостей вторинних метаболітів саме у клітинах первинної кори пов'язана з їх захисними функціями [9].

За результатами гістохімічних досліджень накопичення катехінів найактивніше відбувається у мезокортексі первинної кори і в клітинах серцевинних променів, а також флоєми (рис. 2, а, в). Втім просторово епікатехіни, зазвичай, зосереджені у молодших зонах флоєми. У ксилемі катехіни виявляються лише у паренхімі серцевинних променів.

Очевидно, що у живих тканинах стебла троянди ефіроолійної відбувається не тільки базипетальний і латеральний транспорт фенолів, а і їх синтез. Даний процес є досить інтенсивним у здерев'янілих пагонах і мало виражений у рослин під час культивування на живильних середовищах у стерильних умовах. Слід зазначити, що активація синтезу поліфенолів відбувається у відповідь на травматичне ушкодження тканин первинних експлантатів за введення рослин в культуру *in vitro*. Саме цей етап є найкритичнішим в отриманні життєздатних експлантатів.

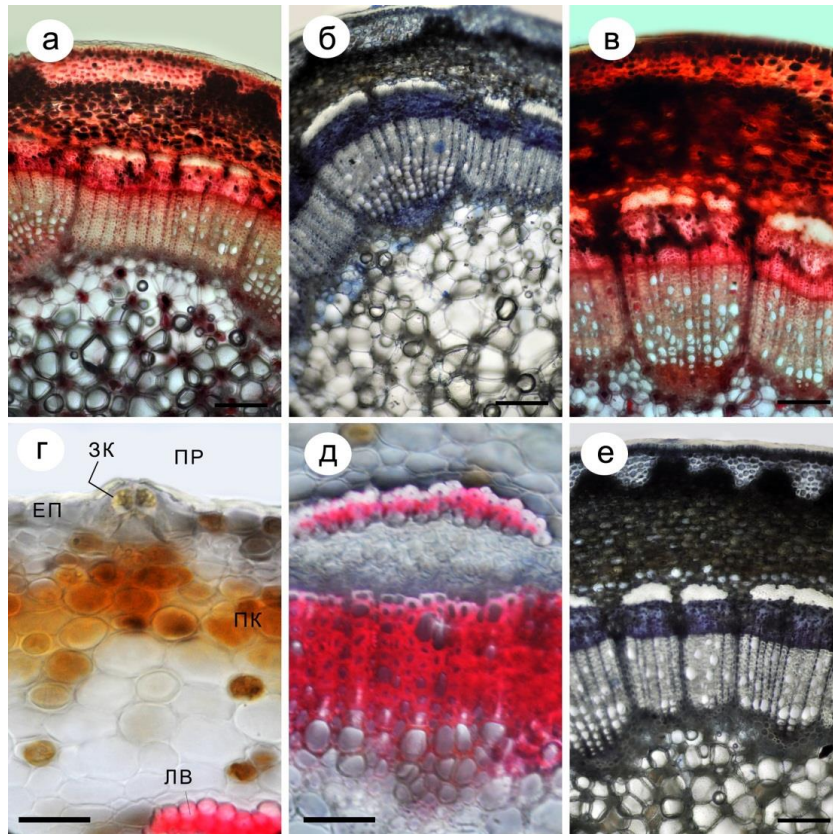


Рис. 2. Особливості гістогенезу і локалізація катехінів (а, в) і білка (б, е) у тканинах стебла троянди ефіроолійної: а-б – сорт Лада, в-е – сорт Радуга; г – формування продиху на стеблі рослини-регенеранту в умовах *in vitro*: зк – замикаючі клітини, пр. – продих, еп – епідерма, лв – луб'яні волокна, пк – паренхіма мезокортексу; д – поступове відкладення лігніну на стінках клітин ксилеми і екстраксілярних волокон (лінійка: а-в, е – 150 мкм; г, д – 50 мкм)

Окислення і полімеризація фенольних продуктів призводить до інактивації ферментів, блокування транспортних систем ксилеми, які забезпечують живлення клітин камбію і апікальних меристем.

Отже, для успішної регенерації первинних експлантатів доцільними є застосування хімічних регуляторів, які гальмують процеси фенілпропаноїдного синтезу і дозволяють зменшити інтенсивність аутоінтоксикації живих тканин.

Висновки. Показано, що в первинній корі, клітинах серцевинних променів і паренхімі флоєми однорічних пагонів троянди ефіроолійної сортів Лань, Лада та Радуга інтенсивно накопичуються катехіни і конденсовані таніни. У разі травматичного стресу в живих тканинах активізуються процеси окиснювання і полімеризація поліфенолів, що призводить до блокування латерального

транспорту поживних речовин, що негативно впливає на життєздатність тканин первинних експлантатів. Локалізація білків просторово пов'язана із зосередженням основної маси катехінів та інших поліфенольних сполук.

За культивування рослин-регенерантів в умовах *in vitro* тканини стебел троянди ефіроолійної набувають ознаки ювенільності. Визначені анатомо-гістохімічні особливості пагонів пов'язані зі специфікою міксотрофного живлення і гормонального статусу рослин, на фоні якого гальмується формування вторинних клітинних стінок.

Список літератури

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / В. А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Дженсен У. Ботаническая гистохимия / У. Дженсен. – М.: Мир, 1965. – 377 с.
3. Запрометов М. Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функция в растениях. / М. Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
4. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений / Х. Н. Починок. – К.: Наукова думка, 1976. – 336 с.
5. Рубцова О. Л. Рід *Rosa* L. в Україні: генофонд, історія, напрями досліджень, досягнення та перспективи / О. Л. Рубцова. – Київ: Фенікс, 2009. – 375 с.
6. Рубцова О.Л., Чижанькова В.І. Селекція троянд: історія, досягнення, сучасна стратегія // Інтродукція рослин. – 2015. – № 1. – С.69 – 75.
7. Функции и свойства антоцианов растительного сырья / А.М. Макаревич, А.Г. Шутова, Е. В. Спиридович, Е. В. Решетников. // Труды БГУ. – 2010. – №2. – С. 1-11.
8. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей / Г.Г. Фурст. – М.: Наука, 1979. – С. 40-65.
9. Charles S. B. Flavonoids: new roles for old molecules / S. B. Charles, N. Imin, M. A. Djordjevic. // Journal of Integrative Plant Biology. – 2010. – №52. – С. 98-111.
10. 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. Mудay. // The Plant Cell. – 2004. – №16. – С. 1191-1205.
11. Ray F. E. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development / F. Evert Ray. // New Jersey: Hoboken. – 2006. – С. 473-501.

References

1. *Andreeva V. A.* (1988), Ferment peroksydaza: uchastye v zashchytном mekhanizme rastenyi [The enzyme peroxidase: participation in the defense mechanism of plants]. M.: Science, 128 p.
2. *Dzhensen, U.* (1965), Botanycheskaia hystokhymyia [Botanical histochemistry]. M.: World, 377p.
3. *Zaprometov, M. N.*(1993), Fenolnye soedyneniya. Rasprostraneniye, metabolizm y funktsiya v rastenyiakh [Phenolic compounds. Distribution, metabolism and function in plants]. M.: Science, 272p.
4. *Pylunskaiia, O. A.* (1999), Vvedeniye v kulturu in vitro rozy efyromaslychnoi [Introduction to culture in vitro aromatic rose]. Proceedings of the Crimean State Agricultural University, pp.88-97
5. *Pochynok, Kh. N.* (1976), Metody byokhymycheskoho analiza rastenyi [Methods of biochemical analysis of plants]. K.: Scientific thought, 336p.
6. *Rubtsova, O.L.* (2009), Rid *Rosa L.* v Ukraini: henofond, istoriia, napriamy doslidzhen, dosiahnennia ta perspektyvy [The genus *Rosa L.* in Ukraine: gene pool, history, research areas, developments and prospects]. K.: Phoenix, 375p.
7. *Rubtsova, O.L. and Chyzhankova, V.I.* (2015), Seleksiia troiand: istoriia, dosiahnennia, suchasna stratehiia [Rose Selection: history, achievements, modern strategy]. Introduction plants №1, pp.69-75
8. *Furst, G.G.* (1979), Metody anatomo-hystokhymycheskoho yssledovaniya rastytelnykh tkanei [Methods of anatomical and histochemical study of plant tissues]. M.: Science, pp. 40-65
9. *Charles, S. B., Imin, N. and Djordjevic, M. A.* (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. Journal of Integrative Plant Biology №52, pp. 98–111
10. *Charles, S. B. and Muday, G. K.* (2004), The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of arabidopsis roots to gravity and light. The Plant Cell №16, pp. 1191–1205
11. *Ray, F. E.* (2006), Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development . New Jersey: Hoboken, pp. 473–501.

АНАТОМО-ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОБЕГОВ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ

О. А. Олейник, М. Д. Мельничук, А. А. Клюваденко, А. Ф. Лиханов

Аннотация. В статье приведены результаты гистохимического анализа побегов розы эфиромасличной сортов Лань, Лада и Радуга до введения в культуру *in vitro* и в культуре *in vitro*. Химическими реакциями на срезах побегов обнаружено локализацию в тканях крахмала, М-лигнина, основных белков, полифенолов и катехинов. Показано, что для успешной адаптации и регенерации эксплантатов к условиям *in vitro* целесообразно использование химических регуляторов, которые способны тормозить процессы аутоинтоксикации живых тканей.

Ключевые слова: гистохимический анализ, роза эфиромасличная, полифенолы, крахмал, белки, катехины

ANATOMICAL AND HISTOCHEMICAL FEATURES OF THE SHOOTS OF PROSPECTIVE VARIETIES OF *ROSA DAMASCENA* MILL.

O. Oliynyk, M. Melnychuk, A. Kluvadenko, A. Likhanov

Abstract. The article contains results of histochemical analysis of shoots of *Rosa damascena* Mill. varieties Lan, Lada and Raduga before the introduction into in vitro culture and in the in vitro culture. There were found the localizations of starch, m-lignin, basic proteins, polyphenols and catechins in the tissues of the stems, while conducting chemical reactions on the dissected shoots. It was shown that for successful adaptation and regeneration of the explants under in vitro conditions it is advisable to use chemical controls, which are able to inhibit the processes of auto-intoxication of living tissues.

Keywords: histochemical analysis, *Rosa damascena* Mill., polyphenols, starch, proteins, catechins