



УДК 632.938:582.746.56:632.7:595.78

© 2012

Т. Л. Демчук, член-кореспондент НАН України І. П. Григорюк,  
А. Ф. Ліханов, член-кореспондент НААН України М. Д. Мельничук,  
А. А. Клюваденко

### Система конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić)

Встановлено, що в листках рослин гіркокаштана червоного, або павії, стійкого до каштанової мінуючої молі, зовнішні та внутрішні тангентальні стінки верхнього епідермісу значно потовщені. Інкрустація клітинних стінок біополімерами перешкоджає проникненню гусениць в м'які тканини мезофілу. У вакуолях верхнього епідермісу листків виявлено значні відкладення базофільних сполук, ймовірно поліфенольної природи, які ускладнюють живлення гусениць на перших стадіях їх розвитку. Показано, що конституціональні ознаки рослин роду *Aesculus* L. мають прямий зв'язок з активністю пероксидази та локалізацією заліза в клітинних стінках рослин.

Каштанова мінуюча міль (КММ) (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić) є одним з найнебезпечніших шкідників родини Лускокрилих (*Lepidoptera*), що уражує листки гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) [1, 2]. З причини їх масового розмноження міські зелені насадження гіркокаштана звичайного до середини липня втрачають до 70–80% асиміляційної поверхні. У результаті істотно знижуються декоративні властивості і здатність рослин виконувати фітосанітарну та естетичну функції. Однак КММ майже не використовує як кормову базу листки інших видів гіркокаштана, зокрема гіркокаштана червоного, або павії (*Aesculus pavia* L.), м'ясо-червоного (*Aesculus carnea* Hayne) та восьмитичинкового (*Aesculus octanadra* March.) [1]. Згідно з наявними даними, метелики каштанової молі в достатньо значній кількості відкладають яйця на поверхню листків цих видів гіркокаштана, однак типові симптоми їх ураження незначні або взагалі відсутні [3]. Механізми стійкості рослин до шкідника не з'ясовані. Як елемент конституціональної стійкості рослин гіркокаштана розглядають показник товщини кутикули поверхні листка [4]. Припущення ґрунтується на тому, що процес пошкодження листків починається на стадії виходу гусениць з яєць, які метелики КММ відкладають на верхній епідерміс листків [2]. Гусениця досить швидко порушує цілісність покривної тканини асиміляційної поверхні та проникає всередину епідермального шару листків рослин.

На першій стадії розвитку шкідник живиться нетвердими компонентами клітин та клітинним соком, який у достатній кількості накопичується в сильно вакуолізованих клітинах епідермісу каштана звичайного [4]. Цілком ймовірно, що стійкість деяких рослин видів роду *Aesculus* L. до КММ обумовлена саме комплексом морфологічних ознак, що створює ефективні бар'єри антибіозу для шкідника і перешкоджає його масовому розмноженню. На думку багатьох дослідників, саме конституціональний імунітет є найефективнішою системою захисту рослин [5]. Розроблено ефективні способи оцінки стійкості видів і гібридів рослин роду *Aesculus* L. до КММ за інтегральними фізіолого-біохімічними показниками [6–8]. З огляду на це метою наших досліджень було провести порівняльний морфологічний аналіз і визначити функціонування окремих складових системи конституціональної стійкості до КММ двох контрастних видів (стійкого і нестійкого) рослин роду *Aesculus* L. — гіркокаштана червоного, або павії, та гіркокаштана звичайного.

**Об'єкти та методи досліджень.** Анатомічні ознаки видів рослин роду *Aesculus* L. з різною стійкістю до КММ вивчали на листках нижнього ярусу 25–30-річних дерев алейних та паркових насаджень Києва. Анатомічну будову листків досліджували на мікроскопічних препаратах. Диференціальне забарвлення тканин проводили сафраніном — водним синім [9]. Як фізіологічний маркер стійкості рослин використовували пероксидазу — поліфункціональний фермент, який забезпечує захисну реакцію рослинного організму на шкодочинну дію фітопатогенних організмів та шкідників [10]. Гістохімічне визначення пероксидази у вільній і зв'язаній з клітинними стінками формах проводили за бензидиновою реакцією [9]. Локалізацію тривалентного заліза в тканинах листка визначали за реакцією з фероціанідом калію [11]. Структуру клітин і клітинних оболонок досліджували методами фазово-контрастної та люмінесцентної мікроскопії на інвертованому мікроскопі Carl Zeiss Axio Observer Z1. Як флюорохром використовували корифосфін (конц. 1 : 1000; рН робочого розчину — 7,8; експозиція при фарбуванні — 10 хв, відмивка в дистильованій воді — 5 хв). Експеримент здійснювали на нативному та зафіксованому рослинному матеріалі. Мікрометричні дослідження проводили в програмі AxioVision 40V.

**Результати та їх обговорення.** В аспекті стійкості рослин гіркокаштана до КММ одними з найважливіших є анатомічні показники механічної міцності епідермісу листків, який створює первісний бар'єр для фітофагів. Наші дослідження показали, що у рослин гіркокаштана червоного радіальні, зовнішні і внутрішні тангентальні клітинні стінки верхнього епідермісу листків є товстішими та здерев'янілішими, ніж у каштана звичайного. Потовщення клітинних оболонок верхнього епідермісу відбувається доцентрово, шляхом апозиції (ріст накладенням). Враховуючи, що листки формувались в однакових екологічних умовах, можна припустити, що дані ознаки у рослин гіркокаштана червоного є досить консервативними і визначаються спадковими особливостями.

Фазово-контрастна мікроскопія дозволила встановити структурну гетерогенність клітинних оболонок верхнього епідермісу. За оптичними властивостями в тангентальних клітинних оболонках нами виділено два зовнішні світлі шари, що на мікропрепаратах виявлялися лише за сильно яскравим світінням, і середній оптично темний прошарок завтовшки 0,7–1,2 мкм, який розділяє клітинну оболонку на зовнішню та внутрішню зони (рис. 1, в, г, д). Така специфічність у будові клітин може бути пов'язана з особливостями просторової орієнтації целюлозних мікрофібрил, а також наявністю інших нецелюлозних компонентів, які входять до складу клітинної оболонки.

В будові епідермісу рослин гіркокаштана звичайного структура клітинної оболонки дещо інша. Внутрішні тангентальні стінки значно тонші та менш здерев'янілі, ніж у гіркокаштана

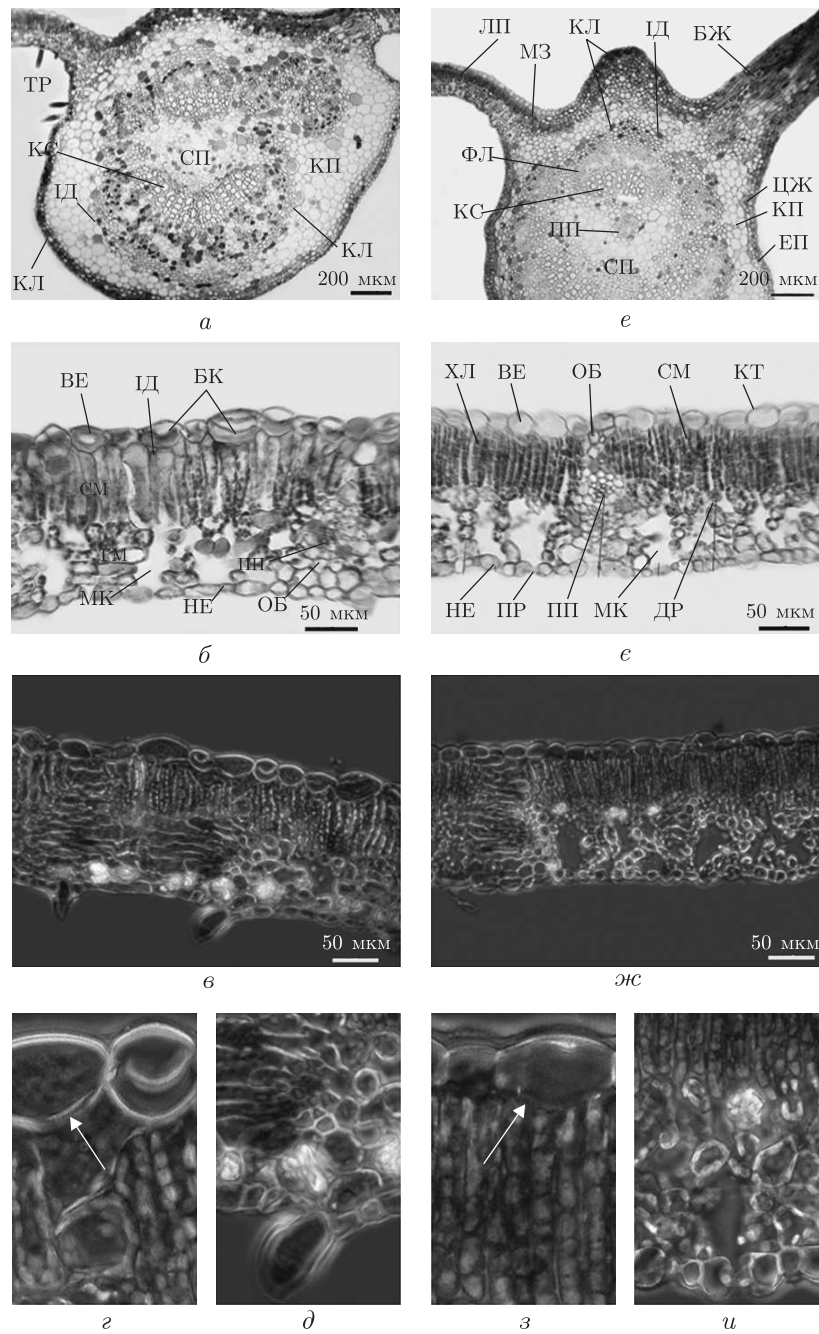


Рис. 1. Поперечний розріз листової пластинки гіркокаштана червоного (а-д) та гіркокаштана звичайного (е-и): а, е — центральна жилка; б, е — диференціальне забарвлення тканин листка; в, жс — фазово-контрастна мікроскопія тканин листків; з, д, з, и — структурні елементи листків у фазовому контрасті; стрілками позначені внутрішні тангентальні стінки верхнього епідермісу листків.

ЦЖ — центральна жилка; БЖ — бічна жилка II порядку (елементи провідної системи); ЛП — листовка пластинка; ЕП — епідерміс; ТР — трихома; КЛ — коленхіма; КП — основна паренхіма кори; МЗ — мезофіл; ПП — провідний пучок; ФЛ — флоєма; КС — ксилема; СП — серцевинна паренхіма; ІД — ідіобласти; БЕ — верхній епідерміс; НЕ — нижній епідерміс; КТ — кутикула; СМ — стовпчастий мезофіл; ХЛ — хлоропласт; ГМ — губчастий мезофіл; ОБ — клітини обкладинки провідного пучка; ПР — продих; МК — міжклітинний простір; БК — базофільні компоненти клітин; ДР — друзи

червоного. Цілком можливо, що просочені кутином товсті й здерев'янілі зовнішні оболонки епідермісу здатні перешкоджати проникненню гусениць каштанової молі всередину живих клітин і, таким чином, створювати перший конституціональний бар'єр.

Другим бар'єром у системі конституціональної стійкості листків рослин гіркокаштана червоного можуть бути базофільні сполуки, ймовірно поліфенольної природи, що в значній кількості накопичуються в клітинах верхнього епідермісу (див. рис. 1, б). Хімічні речовини зазвичай дифузно заповнюють протопласт або відкладаються на внутрішніх поверхнях тангентальних стінок. На поперечних зрізах листових пластинок доволі густі відкладення вторинних метаболітів мали виражену смугастість, що пов'язано зі значними коливаннями активності процесів метаболізму. Подібні відкладення зафіксовано нами також у поодиноких клітинах епідермісу гіркокаштана звичайного. В переважній більшості вторинні метаболіти відкладаються дифузно і розміщуються менш компактно, ніж в епідермісі гіркокаштана червоного. В асиміляційних тканинах листків рослин утворювалися крупні кристали оксалату кальцію. У досліджених нами листках гіркокаштана звичайного відкладення друз спостерігалося на межі стовпчастої і губчастої паренхіми, у листках гіркокаштана червоного — у нижніх прошарках абаксіальної поверхні листка між епідермісом та губчастою паренхімою листка (див. рис. 1, в, ж). Більшість клітин верхнього епідермісу гіркокаштана звичайного — це відносно тонкостінні вакуолізовані клітини, зовнішні оболонки яких покриті тонкою, безкольоровою і безструктурною плівкою — кутикулою, що пронизана восковим нальотом, який знижує інтенсивність транспірації листків і, очевидно, проникнення гусениць каштанової молі в тканини листової пластинки.

У рослин гіркокаштана червоного, крім специфічних епідермальних ідіобластів, клітини зі значним вмістом поліфенольних сполук містяться також у палісадній паренхімі. Трансформація клітин мезофіла у фотосинтетично нефункціональні ідіоліти характерна для верхнього шару палісадної паренхіми. В ідіолітах хлоропластів не виявлено, а протопласт заповнювався значною кількістю гетерогенних поліфенольних сполук (див. рис. 1, б). Перелічені ознаки підтверджують високий ступінь захисних властивостей покривних тканин і мезофілу листків гіркокаштана червоного, які гальмують проникнення гусениць в епідермальний шар після відродження й ускладнюють процес живлення м'якими тканинами та клітинним соком на початкових стадіях розвитку.

Третім фізіологічним бар'єром у системі конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. є ферменти групи оксидаз. Одним з ефективних регуляторів процесу формування вторинних клітинних оболонок є пероксидаза — мультифункціональний гемовмісний глікопротеїд, що бере участь у зшиванні полісахаридів через утворення диферулової кислоти [12], каталізує утворення дитиразинових зв'язків за умов лігніфікації і прискорює реакції гідроксилування проліну [10].

Зважаючи на поліфункціональну роль пероксидази в організації множинної системи захисту рослин проти несприятливих чинників, ми використали її як маркер стійкості рослин гіркокаштанів до КММ.

Встановлено, що в тканинах рахісів листків стійких рослин бензидинова реакція на пероксидазу відбувалась інтенсивніше, ніж у нестійких. Перші ознаки ферментативного розкладу пероксиду водню в пошкоджених тканинах стійких рослин гіркокаштана проявлялася через 30–40 с. У листках нестійких до КММ рослин гіркокаштана звичайного гістохімічна реакція затримувалася на 1–2 хв, що може бути пов'язано з низьким пулом не зв'язаних з клітинними стінками ізоферментів та їх уповільненою реакцією на травматичне пошкодження тканин. У рослин стійкого до КММ гіркокаштана червоного перші ознаки гістохі-

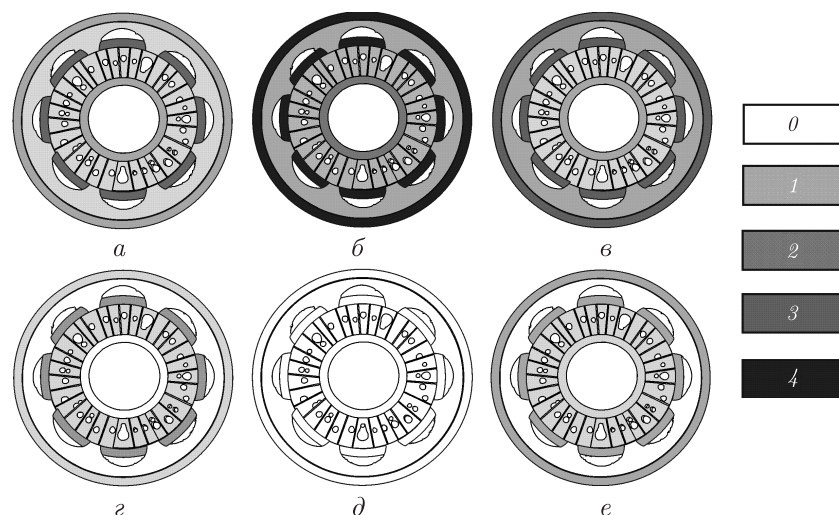


Рис. 2. Локалізація і активність ферменту пероксидази в тканинах рахісів листків рослин роду *Aesculus* L. на початку (*a*, *б*, *в*) та наприкінці (*г*, *д*, *е*) вегетаційного періоду за п'ятибальною шкалою: *a*, *г* — гіркокаштан звичайний, не уражений КММ; *б*, *д* — гіркокаштан звичайний, уражений КММ; *в*, *е* — гіркокаштан червоний, стійкий до КММ

мічної реакції на пероксидазу з утворенням специфічного забарвлення тканин починались через 15–20 с після нанесення реагенту на зріз тканин, що швидше в два рази, ніж у стійких, та в шість разів, ніж у нестійких рослин гіркокаштана звичайного (рис. 2). Для порівняльної оцінки активності пероксидази в тканинах листків видів рослин роду *Aesculus* L. за бензидиновою реакцією нами запропоновано п'ятибальну шкалу (табл. 1).

Вільна і зв'язана з клітинними стінками пероксидаза виявлялася переважно в цитоплазмі й клітинних стінках епідермісу, клітинах камбію, ситоподібних трубках, супутникових клітинах, клітинних стінках прото- та метаксилеми, у тому числі флоємі амфівазальних провідних пучків, які в кількості від одного до п'яти розташовані в оточенні серцевинної паренхіми центральної зони рахісу (рис. 3, *a*, *в*). У стійкого до КММ виду рослин гіркокаштана червоного активні форми ферменту виявлені в ситоподібних трубках, супутникових клітинах та паренхімі флоєми (див. рис. 2, *a*). Рівень концентрації пероксидази істотно залежав від ступеня ураженості листків рослин гіркокаштана гусеницями КММ. За умов перших ознак утворення мін на верхній стороні листкових пластинок активність ферменту значно зростала (див. рис. 2, *б*).

Таблиця 1. Умовна шкала порівняльної оцінки активності пероксидази в тканинах листків видів рослин роду *Aesculus* L.

Бал	Характер реакції
0	Реакція не виявляється
1	Реакція низької інтенсивності (продукти реакції виявляються через 1 хв і довше, локалізовані дифузно, блідо-блакитного кольору)
2	Реакція середньої інтенсивності (продукти реакції блакитного кольору виявляються в тканинах відносно рівномірно через 40–60 с)
3	Реакція високої інтенсивності (продукти реакції темно-синього кольору виявляються рівномірно через 20–40 с)
4	Реакція надзвичайно високої інтенсивності (продукти реакції темно-синього кольору виявляються надзвичайно швидко — через 5–20 с і одразу починають темніти)

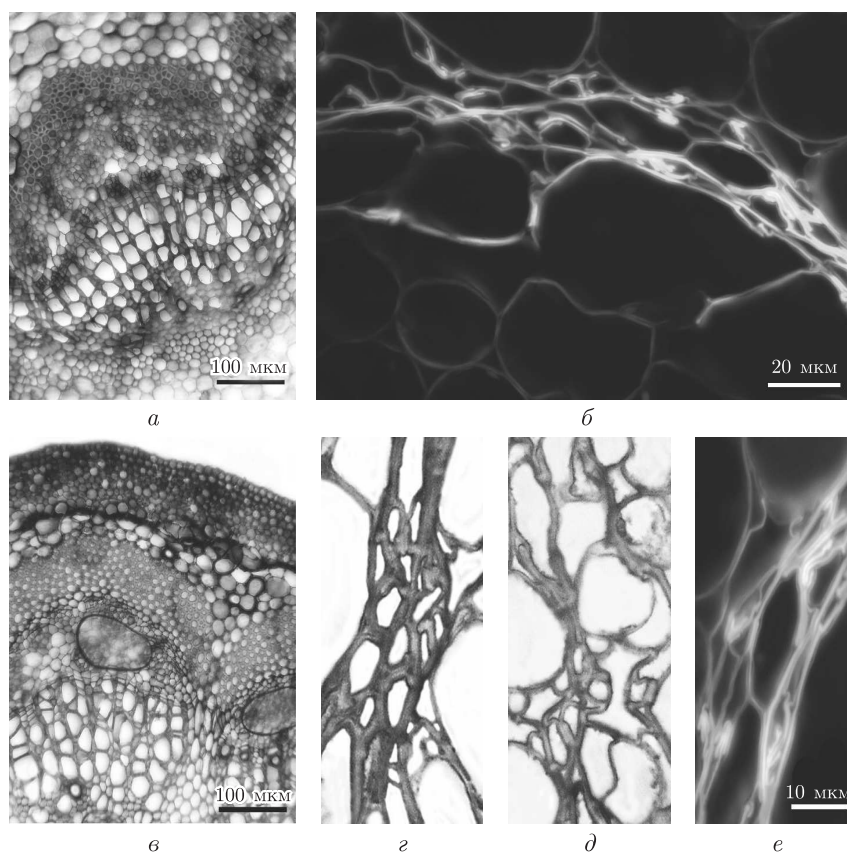


Рис. 3. Гістохімічні особливості рахісів листків гіркокаштана звичайного (*a, d*) та гіркокаштана червоного (*в, г, e*): *a, в* — локалізація пероксидази; *б, e* — люмінесценція клітинних оболонок (фарбування корифосфіном, конц. 1 : 1000); *г, д* — локалізація заліза в клітинних стінках (гістохімічна реакція на іони заліза) та особливості утворення перетинок в прошарку облітерованих клітин кори

Однак в міру збільшення площі ураженої КММ листової поверхні активність пероксидази знижувалася. Наприкінці вегетаційного періоду локалізацію ферменту пероксидази в рахісах листків рослин виявлено нами лише в окремих провідних пучках флоєми. Загальна площа тканин, яка містила активні форми ферменту пероксидази, у стійких рослин гіркокаштана була значно більшою (див. рис. 2, *г, e*), ніж у нестійких (див. рис. 2, *д*).

Для порівняльної оцінки прояву гістохімічних реакцій у різних типах тканин нами запропоновано гістохімічні формули, які складаються з назви тканин (К — кора; В — луб'яні волокна; Ф — флоєма; Км — камбій; Кс — ксилема; С — серцевинна паренхіма) та оцінки характеру гістохімічної реакції в балах. Для показників активності пероксидази в тканинах рахісів листків гіркокаштана звичайного гістохімічні формули такі: для стійкої до КММ форми на початку вегетаційного періоду — К2-Ф3-Км3-Кс1-С1, наприкінці — К1-Ф2-Км2-Кс0-С0; для нестійких до КММ форм — К4-Ф4-Км3-Кс2-С1 та К0-Ф1-Км1-Кс0-С0 відповідно; для гіркокаштана червоного — К2-Ф3-Км3-Кс2-С1 та К2-Ф2-Км2-Кс1-С1. Відносний показник характеру перебігу гістохімічних реакцій в тканинах рослин можна обчислити за формулою

$$A = \frac{\sum_{k=1}^n b_k}{n},$$

де  $A$  — відносний показник гістохімічної реакції (у наших дослідженнях гістохімічна активність пероксидази);  $b_1, b_2, \dots, b_n$  — показники інтенсивності гістохімічної реакції в балах;  $n$  — загальна кількість показників гістохімічних реакцій. Відносний показник зміни активності пероксидази в тканинах рослин за вегетаційний період у наших дослідках розраховували за формулою

$$k = \frac{A_{\text{п}}}{A_{\text{к}}},$$

де  $k$  — коефіцієнт зміни активності ферменту;  $A_{\text{п}}$  — відносний показник активності ферменту на початку вегетаційного періоду;  $A_{\text{к}}$  — відносний показник активності ферменту наприкінці вегетаційного періоду.

Для нестійких до КММ форм гіркокаштана звичайного коефіцієнт зміни становив — 7, для стійких форм — 1,7 та каштана червоного — 1,38.

Крім каталізу окиснювальних реакцій, пероксидаза виконує регуляторну роль в процесах диференціації клітин і організації конституціональної стійкості рослин до стресових абіотичних та біотичних чинників. Так, на початкових стадіях формування листової пластинки в протопласті верхнього епідермісу листків рослин гіркокаштана червоного містилась значна кількість зв'язаної з клітинними стінками пероксидази. Інтенсивність гістохімічної реакції знайшла своє підтвердження і в організації конституціональних особливостей будови верхнього епідермісу листків рослин. Про присутність значної кількості зв'язаної з клітинними стінками пероксидази свідчить і значна кількість іонів тривалентного заліза в клітинних оболонках корої паренхіми та коленхіми рахісу (див. рис. 3, *г, д*). У клітинних стінках луб'яних волокон, де гістохімічно пероксидаза не виявлялась, вміст заліза також був незначним. Найвищий вміст зв'язаного з клітинними стінками ферменту визначено нами в прошарку сильно облітерованих клітин із здерев'янілими стінками, які у вигляді переривчастого кільця наявні в центральній зоні корої паренхіми (див. рис. 3, *в*). Високий ендогенний пул пероксидази сприяє процесу потовщення та лігніфікації вторинних оболонок клітин (див. рис. 3, *б, е*). Крім того, пероксидаза, в комплексі з іншими факторами, що регулюють ростові процеси, значно впливає на морфологію клітин.

За конституціональними і гістохімічними ознаками прошарок облітерованих клітин з товстими оболонками утворюється, імовірно, у результаті пружної деформації клітин корої рахісу, що індуковані вітровим навантаженням на орган внаслідок його високої парусності. У клітинах, що стискаються, активізується синтез пероксидази, активно, але нерегулярно відкладається лігнін, утворюються численні додаткові клітинні перегородки (див. рис. 3, *б, г-е*). Така специфічна і складна організація тканини може мати високу пружність і виконувати функцію ресори, що поглинає енергію бічних навантажень та захищає живі тканини черешка від механічного розриву.

Таким чином, висока стійкість рослин гіркокаштана червоного, або павії, до КММ обумовлена комплексом морфоанатомічних і фізіологічних ознак, зокрема товстими клітинними стінками верхнього епідермісу, наявністю в його клітинах значної кількості поліфенольних сполук, високим пулом та активністю пероксидази, особливо зв'язаних з клітинними стінками кислих ізоформ. Від вмісту і активності ферменту пероксидази залежить ступінь здерев'яніння вторинних клітинних оболонок, що особливо важливо за умов формування механічного бар'єру, який перешкоджає проникненню гусениць каштанової молі в тканини листка. Зв'язана з клітинними стінками пероксидаза є специфічним маркером стійкості видів і гібридів рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінуючої молі.

1. *Трибель С. О., Гаманова О. М., Свентославські Я.* Каштанова мінуюча міль. – Київ: Колобіг, 2008. – 70 с.
2. *Зерова М. Д., Никитенко Г. Н., Нарольський Н. Б. и др.* Каштановая минирующая моль в Украине. – Киев: ТОВ “Веґес”, 2007. – 87 с.
3. *Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В.* Біологія каштанів. – Київ: Логос, 2004. – 380 с.
4. *Гаманова О. М.* Каштанова мінуюча міль та захист гіркокаштану звичайного в міських насадженнях: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. – Київ, 2011. – 20 с.
5. *Вилкова Н. И.* Иммунитет растений к вредным организмам и его биоценотическое значение в стабилизации агроэкосистем и повышении устойчивости растениеводства // Вестн. защиты растений. – 2000. – № 2. – С. 3–15.
6. *Пат. 94883 Україна, МПК (2011.01) A01G 13/00 A01N 27/00 A01P 23/00.* Спосіб оцінки видів і гібридів рослин роду Гіркокаштан (*Aesculus L.*) до каштанової мінуючої моли (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić) / І. П. Григорюк, Т. Л. Демчук, М. Д. Мельничук, О. І. Серга, В. О. Дубровін, С. П. Машковська. – Опубл. 10.06.2011. – Бюл. № 11.
7. *Пат. 95051 Україна, МПК (2011.01) A01G 13/00 G01N 33/50 (2006.01).* Спосіб оцінки видів і гібридів рослин роду Гіркокаштан (*Aesculus L.*) до каштанової мінуючої моли (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić) / І. П. Григорюк, Т. Л. Демчук, М. Д. Мельничук, О. І. Серга, В. О. Дубровін, С. П. Машковська. – Опубл. 25.06.2011. – Бюл. № 12.
8. *Григорюк І. П., Демчук Т. Л., Серга О. І. та ін.* ДНК-маркери і способи оцінки стійкості видів та гібридів рослин роду Гіркокаштан (*Aesculus L.*) до каштанової мінуючої моли (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić) в екологічних умовах Київського мегаполісу: Метод. рекомендації. – Київ: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 29 с.
9. *Фурст Г. Г.* Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. – Москва: Наука, 1979. – С. 40–65.
10. *Андреева В. А.* Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. – Москва: Наука, 1988. – 128 с.
11. *Дженсен У.* Ботаническая гистохимия. – Москва: Мир, 1965. – 377 с.
12. *Рогожин В. В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – Ст.-Петербург: ГИОРД, 2004. – 240 с.

Національний університет біоресурсів  
і природокористування України, Київ

Надійшло до редакції 24.02.2012

**Т. Л. Демчук**, член-кореспондент НАН України **І. А. Григорюк**,  
**А. Ф. Лиханов**, член-кореспондент НААН України **М. Д. Мельничук**,  
**А. А. Клюваденко**

### Система конституціональної устойчивости растений рода *Aesculus L.* к каштановой минирующей моли (*Cameraria ohridella* *Deschka et Dimić*)

Установлено, что в листьях растений конского каштана красного, или павии, устойчивого к каштановой минирующей моли, внешние и внутренние тангентальные стенки верхнего эпидермиса значительно утолщены. Инкрустация клеточных стенок биополимерами препятствует проникновению гусениц в мягкие ткани мезофилла. В вакуолях верхнего эпидермиса листьев выявлены значительные отложения базофильных веществ, вероятно полифенольной природы, которые препятствуют питанию гусениц на первой стадии их развития. Показано, что конституциональные признаки растений рода *Aesculus L.* имеют прямую связь с активностью пероксидазы и локализацией железа в клеточных стенках растений.



**T. L. Demchuk**, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. P. Hrygoriuk**,  
**A. F. Likhanov**, Corresponding Member of the NAAS of Ukraine **M. D. Melnychuk**,  
**A. A. Kliuvadenko**

**The constitutional resistance system of plants of genus *Aesculus* L.  
against chestnut horse mine (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić)**

*The thickening for external and internal tangential walls of the upper epidermis in red chestnut horse tree has been established. Incrustation of cell walls by biopolymers puts obstacles in the way of caterpillars in soft mesophyll tissue. The precipitation of basiphil substances by the polyphenol nature in vacuoles of the upper epidermis is revealed. They hamper the nutrition of caterpillars at the first stage of development. The constitutional characters of plants of genus *Aesculus* L. are directly connected with the peroxidase activity and the iron localization in plants cells.*