

O. S. Fishchuk

Lesya Ukrainka Volyn National University, Ukraine

MICROMORPHOLOGY AND ANATOMY OF THE FLOWER OF GALANTHUS NIVALIS AND LEUCOJUM VERNUM (AMARYLLIDACEAE J. ST.-HIL.)

In the gynoecium of *L. aestivum* there are synascidiate, hemisynascidiate, symplicate, and asymplicate vertical zones. The longest zone is the fertile hemisynascidiate zone and the shortest is the synascidiate zone in the ovary. It was discovered that in *L. aestivum* the peduncle consists of 12 vascular bundles, which are reorganized into two circles of bundles, the outer with massive leading bundles, departing as dorsal bundles of perianth, traces of perianth tepals and septal bundles of carpels and inner circle of bundles over the nests are divided into three groups of ventral carpel bundles are lined up on four, which are located in the center of the ovary and providing nutrition to the ovules. Dorsal carpels bundles are double. Above the locule, ventral bundles of the carpel, as well as the double septal bundles, merge with the dorsal bundles and form a dorsal vein. The outer tepals of the simple perianth have nine vascular traces, and the inner tepals of the perianth have eight vascular traces. Traces of stamens are single-bundle, formed from traces of perianth tepals. The ovary has features of the early stages of fruit morphogenesis and adaptation to disclosure, such as differentiation of mesocarp and endocarp cells, double dorsal bundles of carpels. Structural flower features related to pollen proposal as reward pollinators. Since ovary is a structural basis of the fruit, histological ovary wall differentiation reflects the features of the subsequent morphogenesis of the fruit.

Key words: *Leucojum aestivum*, flower morphology, vascular anatomy, gynoecium.

Надійшла 25.11.2020.

УДК:615.322:547.979.7:547.979.8]-07

doi: 10.25128/2078-2357.20.3-4.5

Н. Й. ЯВОРСЬКА, Н. М. ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

вул. Пекарська, 69, Львів, 79010

e-mail: vorobets_natalia@meduniv.lviv.ua

**ВМІСТ ХЛОРОФІЛІВ І КАРОТИНОЇДІВ У ПАГОНАХ ЛОХИНИ
ВИСОКОРОСЛОЇ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

У статті наведено результати дослідження вмісту рослинних пігментів хлорофілів а і b та каротиноїдів у пагонах *Vaccinium corymbosum* (*V. corymbosum*) сортів Блуджей і Блукроп, екстрагованих різними розчинниками. Проаналізовано вміст пігментів пагонів лохини в різні фенологічні фази росту.

Ключові слова: пагони *Vaccinium corymbosum*, Блуджей, Блукроп, хлорофіли, каротиноїди.

Рослинні пігменти хлорофіли та каротиноїди є не лише відповідальними за поглинання, передачу і перетворення світлової енергії при фотосинтезі протягом вегетації, а й біологічно активними речовинами при терапевтичному застосуванні, оскільки проявляють антиоксидантну, імуномодулюючу, протипухлинну, протизапальну дію, знижують ризик серцево-судинних та вікових захворювань, діабету [2, 3, 8, 9]. Пошук рослин з високим вмістом хлорофілів і каротиноїдів залишається актуальним завданням нутрацевтики, фармації та медицини.

Vaccinium corymbosum L. (лохина високоросла) – багаторічний кущ родини Вересових (Ericaceae), походить з Північної Америки, де росте в болотистих регіонах півночі США та Канади. *V. corymbosum* має високу комерційну цінність і культивується у всьому світі в

регіонах з відповідними кліматичними умовами завдяки їстівним плодам численних сортів, створених упродовж останнього століття. Пагони *V. corymbosum* використовують обмежено, хоча відома їх цінність у якості лікарської рослинної сировини (ЛРС) в інших видів Ericaceae. Тому метою роботи було дослідити вміст хлорофілів а і b та каротиноїдів у пагонах двох сортів *Vaccinium corymbosum* L. у різні фази вегетації, оцінити можливість їх використання в якості ЛРС.

Матеріал і методи досліджень

Збір рослинної сировини (РС) – пагонів *Vaccinium corymbosum* L. сортів Блуджей (раннього терміну дозрівання) і Блукроп (середнього терміну дозрівання) проводили на експериментальній ділянці ТОВ «Беррі Партнер» Львівської області України у фази цвітіння (I), плодоношення (II), восени після плодоношення (III), періоду підготовки до зимового спокою (IV). РС сушили на повітрі в темряві при температурі 22–24 °С і перед використанням подрібнювали до порошкоподібного стану.

Вміст хлорофілів і каротиноїдів визначали спектрофотометрично [1, 13]. Пігменти екстрагували, розтираючи РС у порцеляновій ступці окремо з ацетоном (80 і 100 %) та діетиловим ефіром (100,0–200,0 мг: 2–5 мл охолодженого екстрагенту) в умовах максимального затінення, після чого центрифугували при 5000 об/хв. протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відбирали, а осад ресуспендували відповідним екстрагентом до знебарвлення. Усю надосадову рідину об'єднували і доводили відповідним екстрагентом до 25–50 мл. Оптичну густину екстракту визначали при довжинах хвиль, які відповідають максимумам поглинання хлорофілів а і b та каротиноїдів в екстрагенті, використовуючи екстрагент як розчин для порівняння. Концентрацію пігментів розраховували за наведеними рівняннями. Концентрацію хлорофілу а (хл а), хлорофілу b (хл b), суму хлорофілів а і b (хл а + b) та каротиноїдів розраховували за формулами.

При вилученні пігментів 100 % ацетоном оптичну густину (D) визначали при 662; 644; 440,5 нм, а концентрацію пігментів обчислювали за формулами Холма та Веттштейна [5, 11]:

$$\text{Схл } a, \text{ мг/л} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644},$$

$$\text{Схл } b, \text{ мг/л} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662},$$

$$\text{Схл } (a + b), \text{ мг/л} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644},$$

$$\text{Скар, мг/л} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot (\text{Схл } a + \text{Схл } b).$$

При вилученні пігментів 80 % ацетоном оптичну щільність визначали при 663, 646, 470 нм, а концентрацію пігментів обчислювали за формулами, запропонованими Ліхтенталером [7]:

$$\text{Схл } a, \text{ мг/л} = 12,21 \cdot D_{663} - 2,81 \cdot D_{646}$$

$$\text{Схл } b, \text{ мг/л} = 20,13 \cdot D_{646} - 5,03 \cdot D_{663}$$

$$\text{Скар, мг/л} = (1000 \cdot D_{470} - 3,27 \text{ хл } a - 100 \text{ хл } b) / 229$$

При вилученні пігментів 100 % діетиловим ефіром розрахунки вмісту хлорофілів та каротиноїдів проводили за формулами, запропонованими Вінтерманс, де Мотс (1965) [12] після вимірювання поглинання при 480, 642,5 та 660 нм:

$$\text{Схл } a, \text{ мг/л} = 9,93 \cdot D_{660} - 0,777 \cdot D_{642,5}$$

$$\text{Схл } b, \text{ мг/л} = 17,6 \cdot D_{642,5} - 2,81 \cdot D_{660}$$

$$\text{Схл}(a + b), \text{ мг/л} = 7,12 \cdot D_{660} + 16,8 \cdot D_{642,5}$$

$$\text{Скар, мг/л} = (1,000 \cdot D_{480} - 0,52 \cdot \text{Схл } a - 7,25 \text{ хл } b) / 226$$

Результати були перераховані та виражені в мг/100 г сухої маси РС. Вимірювали також суму хлорофілів а та b (Хл а+b), співвідношення вмісту хлорофілу а до хлорофілу b (Хл а/b), співвідношення каротиноїдів до суми хлорофілів а+b (Кар/Хл а+b). Усі процедури екстракції проводили в умовах слабкого світла, щоб уникнути деградації пігментів.

Статистичний аналіз проводили за допомогою Microsoft Office Excel (2007). Усі лабораторні експерименти проводили в триразовому повторенні, наведені дані – середнє ± стандартне відхилення (SD).

Результати досліджень та їх обговорення

Результати проведеного дослідження свідчать, що вміст хлорофілів а та b у пагонах *V. corymbosum* залежать від екстрагента та фенологічної фази росту, на якій відбирається РС. Найкращим екстрагентом виявився 100 % ацетон, дещо гіршим – 80 % ацетон і діетиловий ефір, хоча загалом рівень вмісту хлорофілів збігався (табл. 1, 2). Усі використані нами екстрагентами виявилися достатньо ефективними для вилучення каротиноїдів. Найбільше хлорофілів у пагонах Блукроп та Блуджей накопичується у фази цвітіння (I), дещо менше – у фази плодоношення (II) та після неї (III), а вміст каротиноїдів зростає від фази I до III (табл. 1, 2). Вміст хлорофілів і каротиноїдів у пагонах *V. corymbosum* сорту Еліот, який ми дослідили раніше, у 2–3 рази вищий порівняно з сортами Блукроп та Блуджей [13]. Така динаміка вмісту хлорофілів очевидно відображає підвищення рівня енергетичної необхідності рослини для забезпечення генеративного відтворення у фазу плодоношення з наступною підготовкою до змін температурного режиму та інсоляції в зимовий період. Певним підтвердженням цього може слугувати зростання співвідношення вмісту хл а/b від фази I до III (табл. 1, 2), оскільки деякими дослідниками показано зв'язок між синтезом хлорофілів та рівнем інсоляції [6], а також з температурними коливаннями [4], хоча й для інших видів рослин.

Таблиця 1

Вміст пігментів та їх співвідношення у пагонах сорту Блуджей, мг/100 г сухої маси

Фази вегетації	Хл а	Хл b	Хл а+b	Кар	Хл а/b	Кар/Хл а+b
100 % ацетон						
<i>за формулами Холма-Ветштейна</i>						
I	17,95±0,331	30,79±1,772	45,45±7,384	4,03±0,743	0,583	0,089
II	17,37±0,354 [#]	14,13±1,299 ^{***}	31,50±1,198 [*]	5,49±0,451 [*]	1,229	0,174
III	18,32±0,374 [*]	14,74±0,312 [#]	32,54±1,150 [#]	5,16±0,445 [#]	6,383	0,159
IV	9,66±0,118 ^{***}	2,87±0,129 ^{***}	12,54±0,112 ^{***}	3,71±0,038 ^{**}	3,365	0,296
80 % ацетон						
<i>за формулами Ліхтеналера</i>						
I	16,24±0,099	10,35±0,046	26,58±0,094	2,17±0,046	1,569	0,082
II	14,31±0,108 ^{***}	5,12±0,038 ^{***}	19,42±0,071 ^{***}	5,30±0,070 ^{***}	2,795	0,273
III	12,94±0,022 ^{***}	6,87±0,028 ^{***}	19,81±0,078 ^{**}	5,02±0,039 ^{***}	1,884	0,253
IV	9,20±0,101 ^{***}	2,04±0,055 ^{***}	11,24±0,067 ^{***}	4,50±0,033 ^{***}	4,510	0,400
Діетиловий ефір						
<i>за формулами Вінтерманс-де Мотса</i>						
I	8,80±0,534	20,98±0,548	29,78±0,300	2,79±0,032	0,420	0,094
II	4,74±0,347 ^{***}	10,38±0,786 ^{***}	15,12±0,739 ^{***}	5,06±0,025 ^{***}	0,457	0,335
III	8,49±0,311 ^{***}	27,87±0,742 ^{***}	36,36±0,450 ^{***}	4,73±0,060 ^{***}	0,305	0,130
IV	2,76±0,420 ^{***}	7,77±1,013 ^{***}	10,53±0,595 ^{***}	4,42±0,252 [#]	0,355	0,420

Примітка: #p ≥ 0,1; *p ≤ 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Водночас, вміст хлорофілів та каротиноїдів, виявлений нами у пагонах лохини високорослої різних сортів та термінів дозрівання є достатньо високим для потенційного використання для здоров'я людини – добове споживання 100–300 мг хлорофілів виявило користь для відновлення різних порушень здоров'я, включаючи деякі види раку у людини [10].

Вміст пігментів у пагонах сорту Блукроп, мг/100 г сухої маси

Фази вегетації	Хл а	Хл b	Хл a+b	Кар	Хл a/b	Кар/Хл a+b
100 % ацетон						
за формулами Холма-Ветштейна						
I	17,48±1,985	20,41±2,171	37,89±2,849	1,84±0,066	0,856	0,049
II	15,97±0,140 [#]	33,56±3,294 ^{**}	49,54±3,313 [*]	5,73±0,143 [#]	0,476	0,116
III	17,77±0,218 ^{**}	24,46±6,069 [*]	42,23±5,929 [*]	6,96±0,017 [#]	0,727	0,165
IV	8,71±1,234 ^{**}	2,35±0,406 [*]	11,06±1,639 ^{**}	3,85±0,555 [*]	3,706	0,348
80 % ацетон						
за формулами Ліхтеналера						
I	14,18±0,053	5,68±0,089	19,85±0,040	3,07±0,033	2,500	0,155
II	13,74±0,070 ^{**}	9,39±0,215 ^{***}	23,12±0,157 ^{***}	3,88±0,067 ^{***}	1,463	0,377
III	9,16±0,119 ^{***}	9,81±0,210 ^{**}	18,97±0,104 ^{***}	4,19±0,068 ^{**}	0,933	0,221
IV	5,54±0,502 ^{**}	2,79±0,178 ^{***}	8,33±0,669 [#]	5,35±0,055 ^{***}	1,986	0,642
Діетиловий ефір						
за формулами Вінтерманс-де Мотса						
I	8,83±0,921	2,00±0,015	10,83±0,211	3,08±0,013	4,415	0,283
II	4,23±0,260 ^{***}	4,40±0,017 ^{**}	8,60±0,116 ^{***}	3,65±0,003 ^{***}	0,961	0,424
III	10,02±0,013 [*]	4,18±0,072 [#]	14,22±0,127 ^{***}	4,87±0,002 ^{***}	2,397	0,343
IV	1,68±0,019 ^{***}	3,65±0,021 ^{**}	5,33±0,039 ^{***}	3,43±0,003 ^{***}	0,460	0,644

Примітка: #p ≥ 0,1; *p ≤ 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Висновки

На підставі проведених досліджень виявлено, що вміст хлорофілів і каротиноїдів та їх співвідношення у пагонах різних сортів *V. corymbosum* є високим і змінюється протягом вегетаційного періоду: найвищий вміст хлорофілів спостерігається під час цвітіння, а каротиноїдів – під час плодоношення. Використання пагонів *V. corymbosum* в якості лікарської рослинної сировини потребує урахування вмісту та співвідношення хлорофілів і каротиноїдів на різних фазах їх розвитку.

1. Мусієнко М. М., Паршикова Т. В., Славний П. С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. К. : Фітосоціоцентр, 2001. 200 с.
2. Bernal J., Mendiola J.A., Ibanez E., Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. Vol. 55, No 14. P. 758–774.
3. Eldahshan O. A., Singab Carotenoids A.N.B. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013. Vol. 2, No 1. P. 225–234.
4. Haldimann P. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany*. 1999. Vol. 50, No 333. P. 543–550.
5. Holm G. Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 1954. Vol. 4, No 1. P. 457–471.
6. Lichtenthaler H. K. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research*. 2007. Vol. 92, No 2. P. 163–179.
7. Lichtenthaler K., Welburn A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 1983. Vol. 11, No 5. P. 591–592.
8. Park W. S., Kim H.-J., Dong M. L., et al. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin in Spirulina Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*. 2018. Vol. 23, No 8. P. 2065.
9. Pérez-Gálvez A., Viera I., Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, No 6. P. 505.

10. Siriwatanametanon N. Warfarin-chlorophyll products, herb-drug interactions. *Pharmaceutical Sciences Asia*. 2017. 44, No 4. P. 173–189.
11. Von Wettstein D. Chlorophyll letale and der sub-mikroskopische formweschelder plastiden. *Experimental Cell Research*. 1957. Vol. 12, No 3. P. 427–506.
12. Wintermans J.E.G., de Mots A. Spectrophotometric Characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1965. Vol. 109, No 2. P. 448–453.
13. Yavorska N., Vorobets N. Photosynthetic pigments in shoots of *Vaccinium corymbosum* L. (cv. Elliott). *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health, and Life Quality*. Slovak University of Agriculture in Nitra. 2019. P. 93–100.

References

1. Musiyenko M.M., Parshykova T.V., Slavnyy P.S. Spektrofotometrychni metody v praktytsi fiziolohiyi, biokhimiyi ta ekolohiyi roslyn / K.: Fitosotsiotsentr, 2001. – 200 s. [in Ukrainian]
2. Bernal J., Mendiola J.A., Ibanez E., Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. Vol. 55, No 14. P. 758–774.
3. Eldahshan O. A., Singab Carotenoids A.N.B. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013. Vol. 2, No 1. P. 225–234.
4. Haldimann P. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany*. 1999. Vol. 50, No 333. P. 543–550.
5. Holm G. Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 1954. Vol. 4, No 1. P. 457–471.
6. Lichtenthaler H. K. Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research*. 2007. Vol. 92, No 2. P. 163–179.
7. Lichtenthaler K., Welburn A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 1983. Vol. 11, No 5. P. 591–592.
8. Park W. S., Kim H.-J., Dong M. L., et al. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin in Spirulina Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*. 2018. Vol. 23, No 8. P. 2065.
9. Pérez-Gálvez A., Viera I., Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, No 6. P. 505.
10. Siriwatanametanon N. Warfarin-chlorophyll products, herb-drug interactions. *Pharmaceutical Sciences Asia*. 2017. 44, No 4. P. 173–189.
11. Von Wettstein D. Chlorophyll letale and der sub-mikroskopische formweschelder plastiden. *Experimental Cell Research*. 1957. Vol. 12, No 3. P. 427–506.
12. Wintermans J.E.G., de Mots A. Spectrophotometric Characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1965. Vol. 109, No 2. P. 448–453.
13. Yavorska N., Vorobets N. Photosynthetic pigments in shoots of *Vaccinium corymbosum* L. (cv. Elliott). *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health, and Life Quality*. Slovak University of Agriculture in Nitra. 2019. P. 93–100.

N. J. Yavorska, N. M. Vorobets

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Ukraine

CONTENT OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS IN SHOOTS OF Highbush BLUEBERRIES (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

Since photosynthetic pigments are not only important for plants in photosynthesis, they are also biologically active substances in therapeutic usage, the search for plants with their high content remains an urgent task of nutraceuticals, pharmacy and medicine. In this study, the shoots of *Vaccinium corymbosum* L. varieties Bluejay (early ripening) and Bluecrop (medium ripening) grown in the experimental area in the Lviv region of Ukraine in the phenological phases: in flowering, fruiting, after fruiting, in preparation for winter dormancy have been used. 100 % acetone, 80 % acetone and diethyl ether were used as extractants. The content of chlorophylls and carotenoids was determined spectrophotometrically at wavelengths corresponding to their absorption maxima and calculated by formulas Holm-Wettstein, Lichtenthaler, Wintermans and de Mots.

The findings of the study show that the content of chlorophyll a and b in the shoots of *V. corymbosum* depends on the extractant and the phenological phase of growth at which the plant material is collected. The best extractant was 100 % acetone, slightly worse 80 % acetone and diethyl

ether, although in general the level of chlorophylls coincided. All of the extractants used were effective enough to remove carotenoids. The content of chlorophylls and carotenoids and their ratio in the shoots of investigated varieties of *V. corymbosum* is high and varies during the growing season: the highest content of chlorophylls is observed during flowering: 45.45 ± 7.384 and 37.89 ± 2.849 mg/100 g of dry weight in Bluejay and Bluecrop respectively. The content of carotenoids increases from the flowering phase to fruiting and remains at the same level long after its completion. The highest content of carotenoids was 5.49 ± 0.451 and 5.73 ± 0.143 mg/100 g of dry weight in Bluejay and Bluecrop respectively. It is assumed that the dynamics of chlorophyll content reflects the increase in the level of energy needs of the plant to ensure generative reproduction during the fruiting phase, followed by preparation for changes in temperature and insolation in winter. Some evidence of this may be the increase in the ratio of chlorophylls a/b during this period.

In our opinion, further research on the use of P as a medicinal raw material would be beneficial, taking into account the given results.

Key words: shoots of Vaccinium corymbosum, Bluejay, Bluecrop, chlorophylls, carotenoids.

Надійшла 09.11.2020.