

ный взрыв, образование супероксидного и гидроксидного свободных радикалов, перекиси водорода, синглетного кислорода оказывает токсическое действие на клетку, индуцируя деструктивные процессы в клеточных мембранах.

Представляет большой интерес изучение возможности использования бактерицидных и бактериостатических свойств хитозана. Объектом исследования была выбрана альгологически чистая культура зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*, которую выращивали в присутствии хитозановых гранул с высокой пористостью.

Было показано, что используемый хитозан подавлял рост культуры водоросли. Обнаружено было также понижение содержания хлорофилла в клетках. В присутствии хитозана в водной среде быстро окисляются органические молекулы, появляются свободные радикалы. При этом содержание в ней микроорганизмов снижается на порядок. Изучение состояния культуры *S. quadricauda* с применением флуоресцентной микроскопии выявило высокий процент мёртвых клеток. Обнаружено было также понижение содержания хлорофилла. На протяжении всего периода культивирования наблюдалось увеличение концентрации выделенных метаболитов в среде, что, как известно, отрицательно влияет на рост культуры. Подавление роста культуры вызывается воздействием хитозана как на поверхностные, так и на внутриклеточные структуры водоросли.

Результаты исследования показывают, что применение хитозана довольно перспективно для предотвращения последствий излишнего роста водорослей в водоёмах.

Антиоксидантный потенциал культур *Camellia sinensis* L. в условиях действия фенольных предшественников

Аксенова М. А.^{А*}, Нечаева Т. Л.^А, Загоскина Н. В.^А

^А Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Россия, Москва. *E-mail: akse.masha@yandex.ru

Растениям для поддержания жизнедеятельности необходимы свет и кислород [1,2]. Они регулируют различные метаболические процессы, в том числе за счет образования/инактивации активных форм кислорода (АФК). В оптимальных условиях эти молекулы образуются в небольших количествах, а при стрессовых воздействиях их уровень значительно повышается и может даже сопровождаться «окислительным взрывом» — губительным для клеток. Поддержание баланса между образованием и инактивацией АФК обусловлено функциональной активностью их антиокси-

дантной системы (АС), основными компонентами которой являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты (АО). Все они, присутствуя в меньших концентрациях по сравнению с окисленным субстратом, значительно задерживают или ингибируют его окисление. Высокомолекулярные АО представлены различными ферментами, такими как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза, каталаза и другие, и их считают “первой” линией защиты растительных клеток от окислительного стресса. К низкомолекулярным АО относят различные соединения первичного и вторичного метаболизма растений, в том числе фенольные соединения (ФС), которые представляют уже “вторую” линию защиты. При этом накопление низкомолекулярных метаболитов фенольной природы имеет и практическое значение, поскольку многие их представители могут использоваться в качестве фармакологически ценных препаратов. В связи с этим, проводятся разнообразные исследования по регуляции накопления ФС в растительных клетках, в том числе при помощи соединений - предшественников их биосинтеза [2,3].

Целью работы было изучение образования высокомолекулярных (супероксиддисмутаза и пероксидаза) и низкомолекулярных (фенольные соединения, включая флаванолы и проантоцианидины) антиоксидантов в каллусной культуре *Camellia sinensis* L. в условиях действия таких предшественников как *L*-фенилаланин (ФА), *транс*-коричная кислота (КК) и нарингенин (НГ).

Объектом исследования являлась гетеротрофная каллусная культура чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская популяция). Каллусы выращивали на питательной среде Хеллера (5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 25 г/л глюкозы, 7 г/л агара) в условиях факторостата ИФР РАН (25°C, относительная влажность воздуха 70%, темнота 24 часа) [4]. Продолжительность пассажа составляла 39 дней. При постановке опыта каллусные культуры переносили в жидкую питательную среду Хеллера основного состава (контроль) или содержащую ФА, КК и НГ (3, 1 и 0,5 мМ, соответственно) и ставили на ротерную качалку (90 об./мин). Длительность культивирования – 7 дней.

Оводненность каллусов чая определяли по стандартной методике [5]. Уровень перекисного окисления липидов оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой, определяя содержание малонилового диальдегида (МДА) [6]. Активность супероксиддисмутазы определяли по реакции восстановления нитросинего тетразолия до формазана при участии супероксидных радикалов, образующих систему окисления рибофлавина [7]. Активность пероксидазы оценивали по образованию продукта реакции – тетрагваякола (ТГ) [8]. ФС экстрагировали из растительного материала

96%-ным этанолом [9]. Определение суммарного содержания ФС проводили с реактивом Фолина–Чокалтеу при 725 нм и выражали в мг экв. галловой кислоты (ГК)/ г сухой массы [10]. Количество флаванолов определяли с ванилиновым реактивом при 500 нм и выражали в мг экв. эпикатехина (ЭК)/ г сухой массы [10]. Проантоцианидины определяли с бутанольным реагентом при 550 нм и выражали в мг экв. цианидина (Ц)/ г сухой массы [10].

Сравнение морфологических параметров культур растений *in vitro*, подвергшихся воздействию экзогенных факторов, является важным показателем оценки их физиологического состояния. Каллусные культуры чая, выращенные на жидкой питательной среде, были компактными, достаточно плотными и имели бежевый цвет. На основной питательной среде или на среде с добавлением ФА они имели светло-бежевый цвет. На среде с НГ каллусы были более темного цвета, а на среде с КК - более плотными и темно-бежевыми. Все это указывает на незначительные различия в морфологии каллусных культур чая, выращенных на средах с различными предшественниками ФС, относительно контроля.

Определение содержания воды в каллусной культуре чая не выявило существенных различий между вариантами (табл. 1). Можно отметить статистически значимое его увеличение (на 2%) в культуре только при действии НГ. Следует подчеркнуть, что изменение этого параметра в пределах 5% не свидетельствует о существенных изменениях физиологических процессов клеток. Описанный эффект НГ подтверждается данными, полученными в работе Sharma et al., где была отмечена аналогичная тенденция [11]. Согласно нашим данным, содержание МДА как показателя уровня ПОЛ было статистически равным в каллусах контрольного варианта и тех, которые подвергались обработке ФА и КК (табл. 1). Единственным исключением был вариант с действием НГ, где уровень ПОЛ был в два раза выше контрольного. Полученные нами данные находят свое подтверждение в ряде работ. Так, на примере растений томата не было выявлено статистически значимых изменений уровня ПОЛ при воздействии ФА [12]. Обработка КК не привела к существенным изменениям этого показателя у проростков *Cucurbita ficifolia* [13]. Также имеются данные об обработке НГ проростков *Carthamus tinctorius*, которые аналогичны полученным нами результатам [14].

Таблица 1

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО), суммы фенольных соединений (СФС), фенилпропаноидов (ФП) и флаванов (ФЛ) в каллусных культурах чая, выращиваемых в течение 7 дней на жидкой питательной среде Хеллера основного состава (контроль) или обогащенной L-фенилаланином (ФА; 3 мМ), транс-коричной кислотой (КК; 1 мМ) или нарингенином (НГ; 0,5 мМ)

Параметры	Вариант			
	Контроль	ФА	КК	НГ
ПОЛ, мкМ МДА/ г сух. массы	44.48±6.83 ^b	50.27 ± 2.55 ^b	55.83 ± 9.07 ^b	86.63 ± 10.29 ^a
СОД, ед-ца акт- ти/мг белка	10.67 ± 2.01 ^b	11.48 ± 0.52 ^b	1.06 ± 0.10 ^c	24.23± 0.48 ^a
ПО, мМ ТГ/ мг белка/ мин	70.18 ± 0.71 ^a	60.15 ± 2.90 ^b	53.47 ± 1.67 ^c	43.44 ± 4.43 ^d
СФС, мг экв. ГК/ г сух. массы	7.86 ± 0.71 ^d	16.11 ± 0.71 ^a	9.64 ± 1.03 ^c	14.1 ± 1.07 ^b
ФЛ, мг экв. ЭК/ г сух. массы	4.69 ± 0.49 ^d	13.21 ± 0.88 ^a	8.36 ± 0.78 ^c	10.91 ± 0.55 ^b
ПА, мг экв. Ц/ г сух. массы	12.69 ± 2.32 ^c	29.33 ± 2.33 ^a	20.65 ± 1.67 ^b	27.77 ± 1.03 ^a

СОД считается одним из основных высокомолекулярных антиоксидантов растительных клеток и даже “первичной” линией их защиты от окислительного повреждения. Этот фермент предотвращает окисление макромолекул супероксидными радикалами [1]. Определение активности СОД в каллусных культурах чая выявило статистически значимые различия между контрольным и двумя экспериментальными вариантами (КК и НГ) (табл. 1). Под действием КК активность СОД не превышала таковую контроля и даже была минимальной, что в определенной степени коррелирует с данными по проросткам *Cucumis sativus*, где отмечено отсутствие изменений в активности фермента [13]. При этом наибольшая активность СОД была отмечена в каллусах, выращенных на среде с НГ, где она была почти в 2,5 раза выше, чем в контрольном варианте. Есть несколько работ, подтверждающих эти данные: небольшое, но статистически значимое повышение активности этого фермента было показано у проростков *Carthamus tinctorius* [14]. Что касается каллусов, подвергшихся воздействию ФА, то активность СОД была статистически равна значениям в контроле.

Наши исследования также показали, что активность ПО – фермента, участвующего в детоксикации одной из форм АФК (H_2O_2) – была самой высокой в культуре клеток чая контрольного варианта (табл. 1). В экспериментальных вариантах наблюдалась статистически значимая тенденция

к снижению активности ПО в ряду: Контроль-ФА-КК-НГ. При чем в культуре клеток чая, выращенной на среде с ФА, оно составило 15%, на среде с КК – 24% и на среде с НГ – 40%. Все это свидетельствуют об уменьшении активности ПО при выращивании каллусных культур чая на среде с различными фенольными предшественниками. Аналогичная тенденция была отмечена для проростков *Phaseolus vulgaris*, у которых после воздействия НГ активность данного фермента сократилась почти в три раза по сравнению с контролем [15]. На примере проростков *Cucurbita ficifolia* было показано, что обработка КК не приводила к статистически значимым изменениям активности ПО, также как и обработка ФА, которая не влияла на этот показатель в листьях томатов [12,13].

ФС являются одними из эффективных низкомолекулярных антиоксидантов, которые считаются “второй” линией защиты растительных клеток от действия АФК. Благодаря своим химическим свойствам они взаимодействуют с активными формами кислорода, тем самым снижая их токсическое воздействие на клетки [9].

Определение общего содержания ФС в каллусных культурах чая является важным показателем для оценки их способности накапливать эти вторичные метаболиты. Согласно полученным данным, при выращивании культур клеток на средах с фенольными предшественниками общее содержание ФС было значительно выше, чем в контроле (табл. 2). Наибольшее увеличение этого параметра было отмечено на среде с ФА, когда оно превышало контрольные данные в два раза, что коррелирует с данными на примере листьев *Cicer arietinum* и каллусной культуры *Sequoia sempervirens* [16]. В присутствии НГ содержание ФС увеличивалось на 79%, а в культуре клеток чая, обработанной КК, — на 23% по сравнению с контрольными значениями. Имеются данные, подтверждающие увеличение накопления ФС в проростках *Carthamus tinctorius* и *Vigna radiata* в присутствии НГ, при этом в первом случае этот показатель увеличивался почти в два раза [11,14].

Основными компонентами фенольного комплекса не только чайного растения, но и полученных из него культур *in vitro*, являются флаванолы, которые в последние годы также считаются веществами, обладающими антиоксидантной активностью [4]. Согласно полученным данным, поступление всех фенольных предшественников в каллусы чая способствовало активации фенольного метаболизма, что сопровождалось накоплением характерных для них флаванолов (табл. 1). В то же время наиболее эффективными “регуляторами” этого процесса были ФА (увеличение на 150%) – участник начальных стадий биогенеза ФС, а также НГ (превышение на 130%) — важный промежуточный продукт флавоноидного пути.

На примере листьев *Triticum aestivum* также было показано значительное увеличение содержания флаванолов в присутствии ФА [3].

Чайное растение и каллусные культуры, полученные из него, характеризуются образованием олигомерных форм ФС — проантоцианидинов [4]. Определение их содержания в культурах клеток чая показало стимулирующий эффект всех предшественников (табл. 1). Наибольшее его количество отмечалось в каллусах, выращенных на средах с ФА и НГ, которые почти в равной степени превышали значения контрольного варианта (в 2,3 и 2,2 раза соответственно). Полученные нами данные о действии ФА подтверждены на примере листьев пшеницы [3]. В то же время действие КК увеличивало содержание этих соединений всего в 1,6 раза по сравнению с контрольным вариантом.

Что касается индивидуального эффекта каждого предшественника, то повышающий эффект ФА был наиболее выражен для всех классов ФС. Обработка НГ, в свою очередь, оказала аналогичный эффект, но он был менее выражен. В то время как обработка КК оказала наименьшее влияние на эти параметры.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что культивирование каллусной культуры чая на средах с различными предшественниками сопровождалось увеличением накопления в них низкомолекулярных фенольных антиоксидантов, в том числе флаванолов — веществ, обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью.

Антиоксидантная система играет важную роль в сохранении жизнедеятельности растений, а также в их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Их основными компонентами являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты, баланс которых определяет наличие активных форм кислорода в клетке и их детоксикацию. При этом высокомолекулярные антиоксиданты, представленные различными ферментами, считаются первой линией защиты, а низкомолекулярные — второй и, возможно, дополнительной, функциональная активность которых проявляется на более поздней стадии воздействия различных факторов. И этот тезис полностью соответствует данным, полученным нами для культур клеток чая. После воздействия различных предшественников наблюдалось изменение активности ферментативных антиоксидантов. При этом активность СОД различалась в двух вариантах опыта: обработка КК способствовала ее снижению, в то время как обработка НГ повышала ее. Что касается активности ПО, то при воздействии предшественников она всегда была ниже, чем в контрольном варианте. Однако увеличивалось накопление низкомолекулярных антиоксидантов фенольной при-

роды. Возможно, именно накопление этих метаболитов послужило основой для поддержания уровня ПОЛ в большинстве изученных вариантов обработки на уровне контроля.

Важно также отметить тот факт, что, используя различные предшественники ФС в качестве компонентов питательных сред для выращивания культур растительных клеток, можно в определенной степени регулировать накопление в них веществ, обладающих антиоксидантной активностью, в частности полифенолов. Для каллусных культур чая наиболее перспективным регулятором их накопления был ФА, в присутствии которого их содержание увеличивалось почти в два раза и проявлялось не только на уровне общего содержания этих метаболитов, но и на уровне флаванолов — веществ, обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью.

Библиографические ссылки

1. Yadav, A., Singh, D., Lingwan, M., Yadukrishnan, P., Masakapalli, S. K., Datta, S. Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(9), 1270-1292.
2. Considine, M. J., & Foyer, C. H. Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Physiology*, 2021, 186(1), 79-92.
3. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, B.; Zulfikar, F.; Raza, A.; Mohsin, S.; Mahmud, J.; Fujita, M.; Fotopoulos, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 2020, 9, 681.
4. Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* 2020, 26, e00450.
5. Feduraev, P.; Skrypnik, L.; Riabova, A.; Pungin, A.; Tokupova, E.; Maslennikov, P.; Chupakhina, G. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. *Plants* 2020, 9, 476.
6. Zubova, M.; Nechaeva, T.; Kartashov, A.; Zagorskina, N. Regulation of the phenolic compounds accumulation in the tea-plant callus culture with a separate and combined effect of light and cadmium ions. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2020, 47, 593–604.
7. Tomilova, S.V.; Kochkin, D.V.; Tyurina, T.M.; Glagoleva, E.S.; Labunskaya, E.A.; Galishev, B.A.; Nosov, A.M. Growth and biosynthetic profiles of callus and suspension cell cultures of two rare foxglove species, *Digitalis grandiflora* Mill. and *D. ciliata* Trautv. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 2022, 149, 213–224.
8. Senthilkumar, M.; Amaresan, N.; Sankaranarayanan, A. Estimation of malondialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid (TBA) assay. In *Plant-Microbe Interactions*; Springer Protocols Handbooks: New York, NY, USA, 2021; pp. 103–105.
9. Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 44, 276–287.
10. Henry, E.W.; Jordan, W.; III. The enzymic response of pea (*Pisum sativum*) stem sections to applied indoleacetic acid, gibberellic acid and ethrel: Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 1977, 84, 321–327.

11. Kumar, S.; Abedin, M.M.; Singh, A.K.; Das, S. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*; Springer Nature: Singapore, 2020; Volume 1, pp. 517–532.
12. Goncharuk, E.A.; Zubova, M.Y.; Nechaeva, T.L.; Kazantseva, V.V.; Gulevich, A.A.; Baranova, E.N.; Lapshin, P.V.; Katanskaya, V.M.; Aksenova, M.A.; Zagorskina, N.V. Effects of Hydrogen Peroxide on In Vitro Cultures of Tea (*Camellia sinensis* L.) Grown in the Dark and in the Light: Morphology, Content of Malondialdehyde, and Accumulation of Various Polyphenols. *Molecules* 2022, 27, 6674.
13. Sharma, P.; Gautam, A.; Kumar, V.; Khosla, R.; Guleria, P. Naringenin reduces Cd-induced toxicity in *Vigna radiata* (mungbean). *Plant Stress* 2021, 1, 100005.
14. Almas, H.I.; un-Nisa, Z.; Anwar, S.; Kausar, A.; Farhat, F.; Munawar, M.; Khalizadieh, R. Exogenous application of methionine and phenylalanine confers salinity tolerance in tomato by concerted regulation of metabolites and antioxidants. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021, 21, 3051–3064.
15. Ding, J.U.; Sun, Y.; Xiao, C.L.; Shi, K.; Zhou, Y.H.; Yu, J.Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 3765–3773.
16. Hatamipoor, S.; Shabani, L.; Farhadian, S. Supportive effect of naringenin on NaCl-induced toxicity in *Carthamus tinctorius* seedlings. *Int. J. Phytoremediation* 2023, 25, 889–899.
17. Ozfidan-Konakci, C.; Yildiztugay, E.; Alp, F.N.; Kucukoduk, M.; Turkan, I. Naringenin induces tolerance to salt/osmotic stress through the regulation of nitrogen metabolism, cellular redox and ROS scavenging capacity in bean plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2020, 157, 264–275.
18. Kolupaev, Y.E.; Horielova, E.I.; Yastreb, T.O.; Ryabchun, N.I. State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res. Commun.* 2020, 48, 165–171.

Анализ воздействия антигололедных реагентов на ростовые процессы высших растений и синтез АФК в клетках корня

**Алексеева М. И.^{A*}, Черныш М. А.^A, Мацкевич В. С.^A,
Демидчик В. В.^A**

^A Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, г. Минск, Беларусь. *E-mail: aliakseyeva_mi@mail.ru.

Основной причиной солевого стресса в городских условиях является использование антигололедных реагентов в зимний период времени в странах с холодным климатом. В состав антигололедных реагентов входят химические вещества, которые понижают температуру замерзания воды и затормаживают образование льда. Наиболее часто для этих целей используется NaCl из-за его доступности, низкой стоимости и невысокой токсичности для человека. Однако, в высоких концентрациях он токсичен для