

*На правах рукописи*



**ЗУБОВА МАРИЯ ЮРЬЕВНА**

**ФЛАВАНЫ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ (*CAMELLIA  
SINENSIS L.*): ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ**

1.5.21. – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в группе фенольного метаболизма растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Загоскина Наталья Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

**Соловченко Алексей Евгеньевич**

доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

**Шелепова Ольга Владимировна**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и иммунитета растений, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук»

**Ведущая организация:**

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Защита состоится «15» декабря 2022 г. в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.138.01 по специальности 1.5.21– “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: +7 (499) 678-54-20, электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)

**Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.**

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



**Азаркович Марина Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одной из особенностей высших растений является способность к образованию различных вторичных метаболитов (Bourgand et al., 2001; Delgoda, Murray, 2017; Носов, 2021). К числу наиболее распространенных их представителей относятся фенольные соединения (ФС), характеризующиеся высокой биологической активностью и чрезвычайным структурным разнообразием (Запрометов, 1996; Bidel et al., 2010; Куркин, 2016; Vuolo et al., 2019; Albuquerque et al., 2021). Наиболее восстановленными соединениями крупнейшего класса этих вторичных метаболитов, а именно флавоноидов, присутствующих во всех клетках и тканях высших растений, являются флаван-3-олы (ФЛ), представленные катехинами (флаван-3-олами) и их олигомерными производными – проантоцианидинами (ПА) (Samanta et al., 2011; Wang, Li, 2018; Yu et al., 2020).

ФС, в том числе ФЛ, участвуют в регуляции роста и развития растений, гормонального баланса, окислительно-восстановительных процессов, защите клеток от действия разнообразных биотических и абиотических стрессоров (Spencer, Crozier, 2012; Karak et al., 2019; Agati et al., 2020). Поступая в организм человека, многие из этих соединений фенольной природы сохраняют свою биологическую активность и могут оказывать антиоксидантное, антиканцерогенное, противовоспалительное, антибактериальное действие, что во многом обусловлено их высокой антиоксидантной способностью (Тараховский и др., 2013; Nile et al., 2018).

В настоящее время путь биосинтеза ФС достаточно хорошо изучен (Dixon, 2005; He et al., 2008; Yu et al., 2019). Однако до сих пор нет единого мнения об этапе превращения флаван-3-олов (катехинов) в ПА – стадии олигомеризации. Предполагается, что этот процесс может происходить либо при участии ферментов (пероксидазы, полифенолоксидазы или лакказы), либо неферментативным путем за счет автоконденсации (Karonen et al., 2007; He et al., 2008; Dixon, Sarnala, 2020). Изучение данного вопроса представляет особый интерес в связи с фармакологической активностью этих соединений и, следовательно, возможностью их использования для профилактики и лечения различных заболеваний (Tian et al., 2008; Тараховский и др., 2013; Zhu, Xie, 2020).

Растения чая (*Camellia sinensis* L.) представляют собой уникальный объект для таких исследований, поскольку для них характерно накопление ФЛ (Запрометов, 1979; Kerio et al., 2013; Zhao et al., 2017). Поскольку для выращивания чая требуются специальные почвенно-климатические условия, то одним из подходов при изучении его метаболизма могут быть инициированные из него культуры клеток и тканей, сохраняющие способность к образованию этих метаболитов в условиях *in vitro* (Wang, 2012; Загоскина и др., 2015; Sutini, 2017). Кроме того, клеточные культуры растений являются перспективными продуцентами биологически активных веществ, к числу которых относятся и ФС, продуктивность которых регулируется воздействием различных экзогенных факторов (Singh, 2018, Phillips, Garda, 2019; Носов, 2020).

**Цель исследования:** изучение особенностей образования флаванов, в том числе их олиго- и полимерных форм – проантоцианидинов, в клетках высших растений (на примере *Camellia sinensis* L.) в условиях *in vivo* и *in vitro*, а также регуляции этого процесса в каллусных культурах чая при действии различных экзогенных факторов (свет, ионы кадмия, пероксид водорода).

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать накопление флаванов, в том числе проантоцианидинов, в молодых побегах чайного растения.
2. Изучить особенности образования флаванов и их олигомерных форм – проантоцианидинов, в каллусных культурах стебля чайного растения, выращиваемых в темноте или перенесенных в световые условия.
3. Исследовать ответ клеток каллусных культур стебля чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету, на действие ионов кадмия на уровне накопления флаванов, растворимых и связанных форм проантоцианидинов, активности L-фенилаланинаммиак-лиазы и содержания малонового диальдегида.
4. Изучить воздействие пероксида водорода на каллусные культуры стебля чайного растения различного возраста, выращиваемые в темноте или на свету, на уровне накопления флаванов, различных форм проантоцианидинов, активности гваякол-зависимой пероксидазы и содержания малонового диальдегида.
5. Исследовать состав соединений флаванового комплекса каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету и его изменения при действии кадмия и пероксида водорода.

**Научная новизна.** Впервые проведено исследование особенностей образования ФЛ не только на уровне их суммарного накопления, но и на уровне состава и содержания отдельных метаболитов флаванового комплекса в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету.

Получены приоритетные данные о накоплении как растворимых (свободных) форм ПА, так и связанных их форм в культуре ткани чайного растения и сравнение этих показателей с аналогичными характеристиками в молодых побегах интактного растения.

Установлено стимулирующее действие света на накопление ФЛ на начальных этапах роста каллусных культур чая, а также его влияние на образование отдельных соединений данной природы, в том числе ПА.

Впервые проведен анализ состава ФС, в том числе катехинов и ПА, в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету, высокотехнологичными и точными методами ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС) высокого разрешения.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты имеют теоретическое значение для более глубокого понимания закономерностей образования как мономерных, так и полимерных форм ФЛ в клетках высших растений *in vivo* и *in vitro*, а также предоставляют новый фактический материал об изменениях спектра фенольных метаболитов, синтезируемых в культурах растений чая. Знание особенностей накопления различных групп ФЛ, включая растворимые и связанные ПА, а также отдельных метаболитов флаванового комплекса при различных условиях выращивания (темнота, свет, действие стрессовых факторов) представляет большой интерес для биотехнологии, в частности, при работе с клеточными культурами растений – продуцентами биологически активных веществ фенольной природы для фармакологической промышленности.

**Методология и методы диссертационного исследования.** При выполнении работы использованы различные методические подходы: биотехнологические (культивирование каллусных тканей в условиях *in vitro*, оптимизация условий при изучении действия экзогенных факторов), физиологические (оценка морфологических параметров культур, определение прироста каллусов, оводненности клеток), биохимические (определения содержания ФЛ, ПА, суммы ФС, активности ферментов,

уровня перекисного окисления липидов). Качественный анализ ФС проводили с помощью высокоэффективной и ультраэффективной жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией высокого разрешения, а также с применением программ MetAlign и DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics) для их идентификации.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Для каллусных культур, инициированных из стебля и листа побегов чайного растения, характерно снижение содержания флаванов по сравнению с исходными эксплантами на фоне сохранения накопления проантоцианидинов.
2. Изменения в накоплении флаванов при первичном воздействии света на каллусные культуры чайного растения в большей степени проявляются на уровне катехинов и в меньшей степени - их олиго- и полимерных форм - проантоцианидинов.
3. Воздействие различных экзогенных факторов (кадмий, пероксид водорода) на каллусные культуры чайного растения, выращиваемые в темноте или на свету, не вызывало значительных изменений в накоплении в них флаванов, хотя влияло на относительное количество флаван-3-олов - (-)-эпикатехина и (+)-катехина.

**Публикации и апробация работы на научных мероприятиях.** По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из которых 5 – в изданиях, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки РФ.

Результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, 2016); «9th conference on medicinal and aromatic plants of Southeast European countries» (Bulgaria, 2016); Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, 2017); Международная научно-практическая интернет-конференция «Актуальные проблемы физиологии и биохимии растений» (Сочи, 2017); X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); X и XI Международные симпозиумы «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2018, 2022); XI Международная конференция "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология", (Минск, 2018); «Метаболомика и качество жизни» (Москва, 2019); Межинститутский научный молодежный семинар «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» в ИФР РАН (Москва, 2019); «The 2nd International Congress on Cocoa Coffee and Tea Asia» (Baku, 2022).

**Связь с научными программами.** Работа выполнялась в группе фенольного метаболизма растений ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук в рамках темы НИР (№ 0106-2018-0008) и грантов РФФИ (№ 14-04-01742; № 19-416-230049).

**Личный вклад автора в исследование.** Автор работы принимал непосредственное участие в организации, планировании и проведении экспериментов, в обсуждении результатов и подготовке рукописей к публикации. Результаты получены лично автором или при его активном участии.

**Структура диссертации.** Работа изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, 61 рисунок и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы,

Объекты и методы исследования, Результаты исследований и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Список литературы включает 248 наименований, из них 185 на иностранных языках.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объекты исследования.** Объектами исследования являлись однолетние побеги растений чая (*Camellia sinensis* L.) и инициированные из них каллусные культуры.

Растения двух сортов чая (Колхида, Кимынь) произрастали на опытном участке ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (г. Сочи). Для исследования использовали листья и неодревесневшие зеленые стебли молодых трехлистных побегов (флешей) растений, собранные в период завершения первой волны их роста (конец июня).

Каллусные культуры получали из фрагментов листьев и стеблей флешей чайного растения и выращивали в камере фитотрона ИФР РАН на агаризованной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (5 мг/л) и сахарозу (20 г/л) при температуре 26°C и относительной влажности воздуха 70% в темноте (темновая культура) или при 16-час. фотопериоде (интенсивность света 5000 люкс; световая культура). При изучении действия кадмия (Cd) каллусы чая стеблевого происхождения культивировали на основной питательной среде (контроль) или на среде с добавлением  $6,3 \times 10^{-5}$  М  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  (опыт) в темноте или на свету. При изучении действия пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) каллусы чая, выращиваемые в темноте или на свету на основной питательной среде, в возрасте 24 и 36 дней (середина и конец линейной фазы роста, соответственно), выдерживали 2 часа в воде (контроль) или водном растворе  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \times 10^{-4}$  М, опыт). Далее часть материала фиксировали в жидком азоте для последующих исследований, а другую - помещали на основную питательную среду и культивировали в течение 48 часов. Таким образом, оценивали «быстрый» ответ клеток чайного растения на воздействие  $\text{H}_2\text{O}_2$  (после 2 часов) и «отдаленный» - через 48 часов после воздействия.

Растительный материал для биохимических исследований фиксировали в жидком азоте и хранили при -70°C до проведения исследований.

**Морфофизиологические характеристики** побегов чая оценивали по длине и ширине листовых пластинок; каллусных культур – по их внешним характеристикам (цвет, плотность культуры, наличие некротических участков). Определяли сырой вес каллусов.

**Оводненность** растительных тканей анализировали после их высушивания до постоянного веса при +70°C (Рогожин, Рогожина, 2013).

**Фотосинтетические пигменты** (хлорофиллы а и b) экстрагировали из растительного материал 96%-ным этанолом и анализировали их количество спектрофотометрическим методом (Шлык, 1971).

**Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ)** в растительном материале определяли общепринятым методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Жиров и др., 1982; Лукаткин, Голованова, 1988).

**Фенольные соединения (ФС)** извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом (Олениченко, Загоскина, 2005). Содержание суммы ФС определяли с реактивом Фолина-Дениса (Запрометов, 1971), ФЛ – с ванилиновым реактивом (Запрометов, 1974), ПА – с бутанольным реактивом (Ossipova et al., 2001). Содержание суммы ФС и ФЛ выражали в мг-экв. эпикатехина/г сухой массы, а ПА – в мг-экв. цианидина/г сухой массы.

**Активность L-фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ)** определяли ранее описанным методом, оценивая образование транс-коричной кислоты из L-фенилаланина при 290 нм

(Zucker, 1965; Олениченко, Загоскина, 2005). Количество белка в экстрактах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

**Активность гваякол-зависимых пероксидаз** определяли классическим методом при 470 нм (Henry, Jordan, 1977). Содержание белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

**Определение состава фенольных веществ** проводили в экстрактах растительных тканей методом УЭЖХ. Система УЭЖХ (Acquity UPLC® 2.9.0, Waters Corporation, Милфорд, США) была объединена с масс-спектрометром (2.5 Thermo Fisher Scientific Q Exactive Orbitrap), оснащенный источником ионизации с электрораспылением. Для разделения веществ использовали колонку Acquity UPLC® BEH (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм, Waters Corporation, Уэксфорд, Ирландия). Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Состав элюента: раствор А – 0,1% муравьиная кислота, раствор В – ацетонитрил. Для идентификации веществ использовали значения моноизотопных масс из различных баз данных масс-спектрометрии: Metlin (Guijas et al. 2018), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>), MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>) в программе «DataAnalysis 4.0» (BRUKER Daltonics).

**Содержание кадмия** в каллусной ткани определяли по стандартной методике (Ivanov et al., 2016).

**Статистическая обработка результатов.** Опыты проводили в двух аналитических и трех биологических повторностях. Результаты экспериментов статистически обрабатывали с использованием программ SigmaPlot 12.3. и Excel. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения определений и их стандартные ошибки. Надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по t-критерию Стьюдента при  $p < 0,050$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Образование флаванов в молодых побегах чайного растения

Исследования проводили на одних из наиболее продуктивных и успешно культивируемых на юге России сортов чая - Колхида и Кимынь (Гвасалия, 2018; Рындин и др., 2019). Для молодых побегов сорта Колхида характерно формирование более крупных листьев по сравнению с сортом Кимынь (рис. 1). Их оводненность была практически одинаковой и составляла в листьях сортов Колхида и Кимынь, соответственно, 73% и 71%, тогда как в стеблях - 79% и 81%.



Сорт Колхида



Сорт Кимынь

Рисунок 1. Внешний вид флешей двух сортов чая.

Определение содержания хлорофиллов *a* и *b*, а также их соотношения во флешах чая выявило отличия между сортами (табл. 1). В листьях содержание пигментов было выше, чем в стеблях и эти отличия в большей степени были характерны для сорта Колхида.

Таблица 1. Содержание хлорофиллов *a* и *b* и их соотношение в листьях и стеблях флешей двух сортов чая

Сорт	Орган	Хлорофиллы, мг/г сухой массы			Отношение хлорофиллов <i>a/b</i>
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>	
Колхида	Лист	1,36±0,11 <sup>a</sup>	0,34±0,01 <sup>a</sup>	1,7±0,12 <sup>a</sup>	4,05
	Стебель	0,33±0,04 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,05 <sup>b</sup>	2,82
Кимынь	Лист	0,91±0,04 <sup>c</sup>	0,40±0,07 <sup>a</sup>	1,31±0,10 <sup>c</sup>	2,27
	Стебель	0,53±0,03 <sup>d</sup>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,69±0,05 <sup>d</sup>	3,22

Это свидетельствует о высокой фотосинтетической активности молодых побегов чая сорта Колхида, что согласуется с данными по его продуктивности (Гвасалия, 2018).

Важным показателем при оценке растений чая является содержание в них ФС, в том числе ФЛ - основных компонентов их фенольного комплекса (Запрометов, 1964; Ghabru et al., 2018). В листьях и стеблях флешей обоих сортов чая оно было практически равным (рис. 2а).

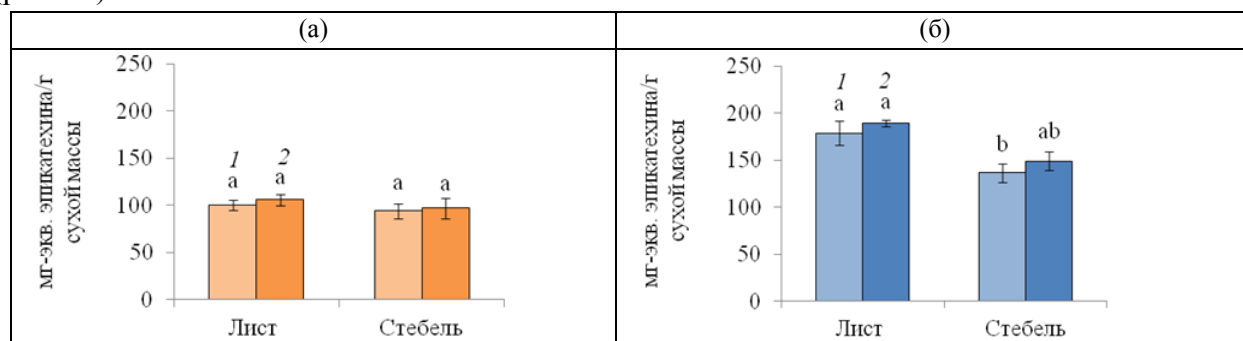


Рисунок 2. Содержание флаванов (а) и суммы фенольных соединений (б) в листьях и стеблях флешей чая сортов Колхида (1) и Кимынь (2).

Иная тенденция характерна для суммарного содержания ФС, как важного показателя биосинтетической способности растительных тканей. В листьях побегов исследованных сортов чая оно было выше, чем в стеблях на 20% (рис. 2б). Это может быть следствием функционирования в них хлоропластов, как одного из основных мест биосинтеза ФС (Запрометов, Николаева, 2003; Chen et al., 2018).

ПА, представляющие собой олигомерные и полимерные формы ФЛ, могут быть представлены в растительных тканях как свободными (растворимыми), так и связанными (нерастворимыми) формами (Ossipova et al., 2001; Min et al., 2012; Shahidi, Yeo, 2016). Содержания растворимых ПА в листьях флешей обоих сортов чая было практически равным и почти в 3 раза ниже, чем в стеблях (рис. 3а).

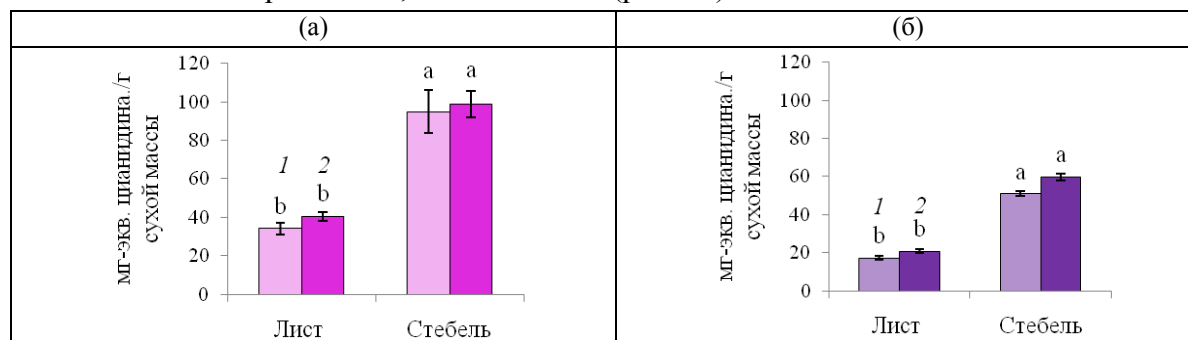


Рисунок 3. Содержание растворимых (а) и нерастворимых (б) проантоцианидинов в листьях и стеблях флешей чая сортов Колхида (1) и Кимынь (2).



Для нерастворимых ПА характерна аналогичная тенденция, но их количество было в 2 раза ниже, по сравнению с растворимыми формами (рис. 3б). Следовательно, в молодых побегах чая доминируют растворимые ПА, накопление которых в большей степени характерно для стеблевых тканей. Это согласуется с литературными данными об отличиях процессов полимеризации флаван-3-олов (катехинов) в различных органах растений (Jiang et al., 2015).

Одним из важных (ключевых) ферментов фенольного метаболизма является ФАЛ. В листьях и стеблях флешей двух сортов чая ее активность была практически равной (рис. 4). Следовательно, в молодых побегах чая активность ФАЛ не служит критерием их способности к образованию ФС.

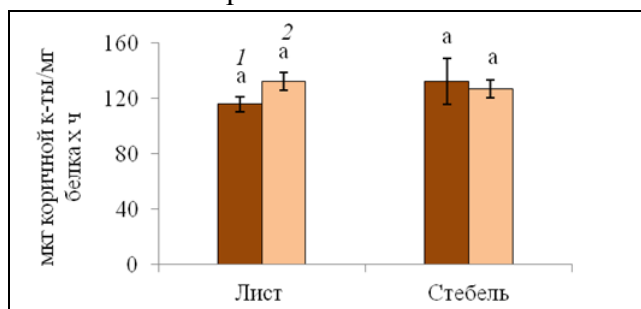


Рисунок 4. Активность *L*-фенилаланин-аммиаклиазы в листьях и стеблях флешей чая сортов Колхида (1) и Кимынь (2).

Все вышеизложенное свидетельствует о значительном сходстве в накоплении ФС, в том числе ПА, в молодых побегах двух сортов чая.

## 2. Особенности образования флаванов в калусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету

Как и в большинстве культур *in vitro*, в калусных культурах чайного растения листового и стеблевого происхождения образование ФС, в том числе ФЛ и ПА, сохранялось. При этом содержание суммы ФС и ФЛ было в 3-5 раз ниже, чем в исходных эксплантах, тогда как накопление ПА не изменялось. Поскольку для стеблевой культуры характерно более высокое содержание ПА именно ее использовали в дальнейших исследованиях.

Калусная культура стебля чайного растения, выращиваемая в темноте, представляла собой медленно растущий плотный каллус светло-бежевого цвета (рис. 5).

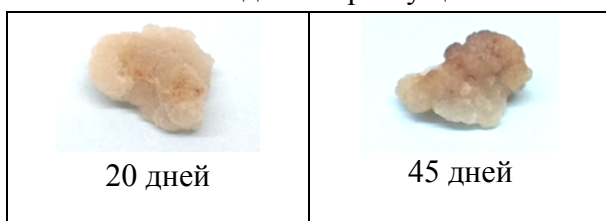


Рисунок 5. Внешний вид калусной ткани стебля чайного растения различного возраста, выращиваемой в темноте.

Прирост ее биомассы повышался до 47 дня культивирования, достигая почти 300% к концу стационарной фазы, после чего резко снижался (рис. 6).

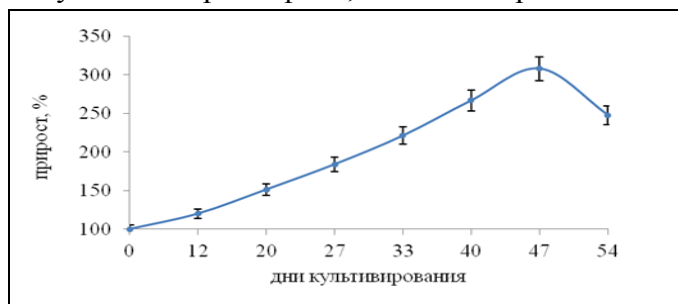


Рисунок 6. Динамика роста калусной культуры стебля чайного растения, выращиваемой в темноте.

Перенесение культуры чая из темновых в световые условия роста сопровождалось ее «уплотнением» и появлением светло-зеленого окрашивания на поверхности каллусов, что свидетельствует о начальных этапах формирования в клетках хлоропластов (рис.7).



Рисунок 7. Внешний вид каллусной ткани стебля чайного растения различного возраста, выращиваемой на свету.

В световых условиях рост каллусов чая замедлялся относительно такового в темноте и к концу пассажа достигал 250% (рис.8).

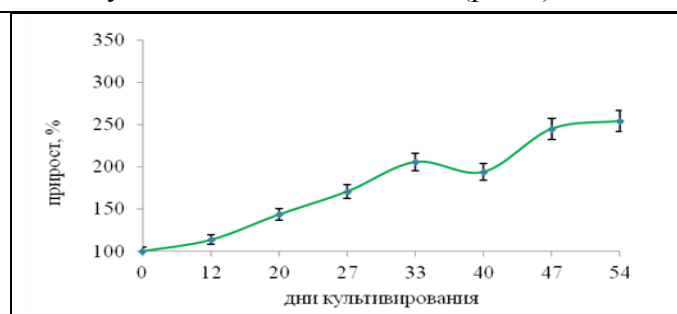


Рисунок 8. Динамика роста каллусной культуры стебля чайного растения, выращиваемой на свету.

Оводненность тканей двух культур чая была схожей и составляла 88-92% в зависимости от фазы роста и условий выращивания (темнота, свет).

Изучение накопления ФЛ в каллусных культурах чайного растения в течение пассажа показало, что при их росте в темноте оно повышалось к концу пассажа (рис. 9а). При этом на 27 и 40 дни роста оно снижалось, что может быть следствием гетерогенности клеток, присущей каллусным культурам растений (Кунах, 1999).

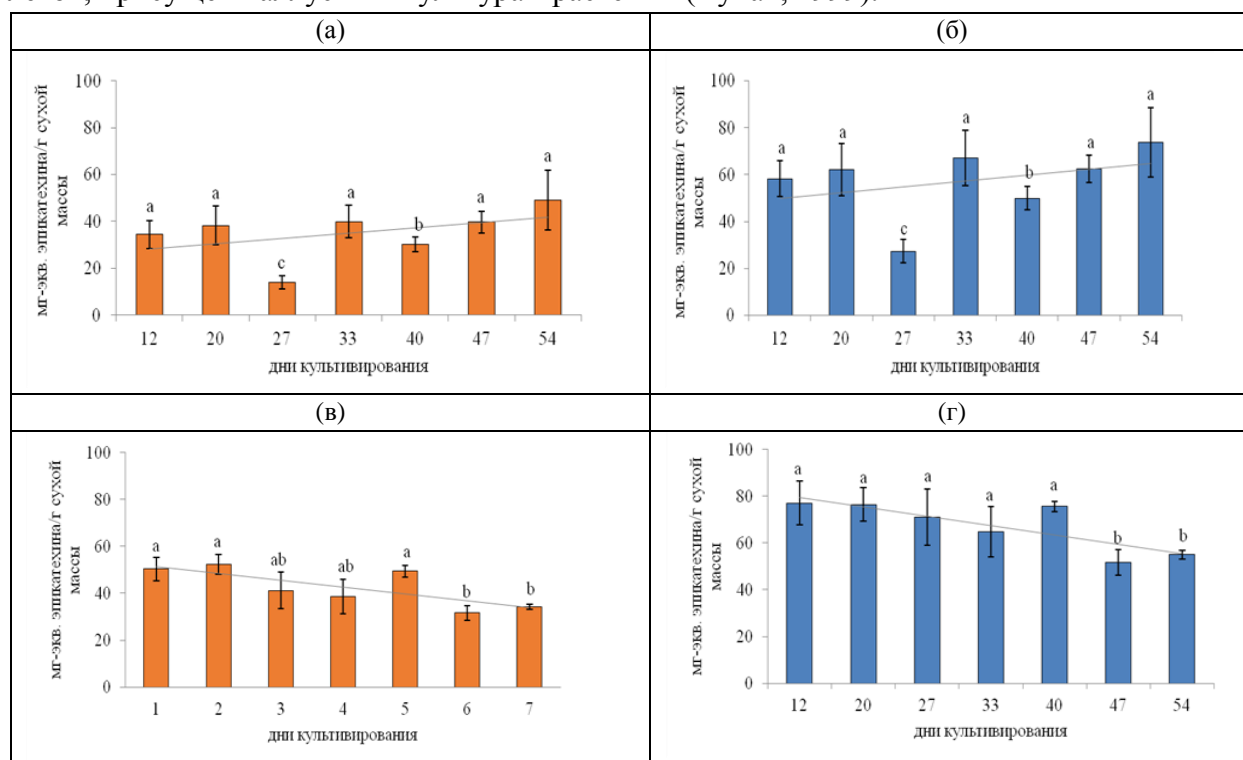


Рисунок 9. Изменения в содержании флаванов (а, в) и суммы фенольных соединений (б, г) в процессе роста каллусной культуры стебля чайного растения, выращиваемой в темноте (а, б) и на свету (в, г).

Определение содержания суммы ФС в нашем случае имеет важное значение для выяснения вклада «флаванового» и «нефлаванового» компонентов в накопление этих вторичных метаболитов в культуре чая. Как следует из полученных данных (рис. 9б), в каллусной культуре, выращиваемой в темноте, оно изменялось аналогично таковому ФЛ. При этом на долю последних в течение всего цикла культивирования приходилось от 51% до 66% от суммарного содержания ФС.

Перенесение культуры чайного растения в световые условия выращивания вызывало изменения в накоплении в них как ФЛ, так и суммы ФС, динамика которых носила схожий характер (рис. 9 в, г). На начальных этапах роста накопление ФЛ было на 25% выше, чем в аналогичный период роста каллусов в темноте (рис. 9в). К концу пассажа оно снижалось, достигая значений аналогичных таковым темновой культуры. Следовательно, активация светом биосинтеза ФЛ происходила преимущественно на начальных этапах роста каллусов чая. Аналогичная тенденция характерна и для накопления суммы ФС (рис. 9г). При этом доля ФЛ в суммарном содержании ФС у культуры чая, перенесенной в световые условия, была выше таковой темного каллуса и составляла от 58% до 68% в зависимости от стадии роста.

Исследование содержания как растворимых, так и нерастворимых ПА показало их увеличение в процессе роста культур чая, выращиваемых в темноте, и снижение – на свету (рис. 10).

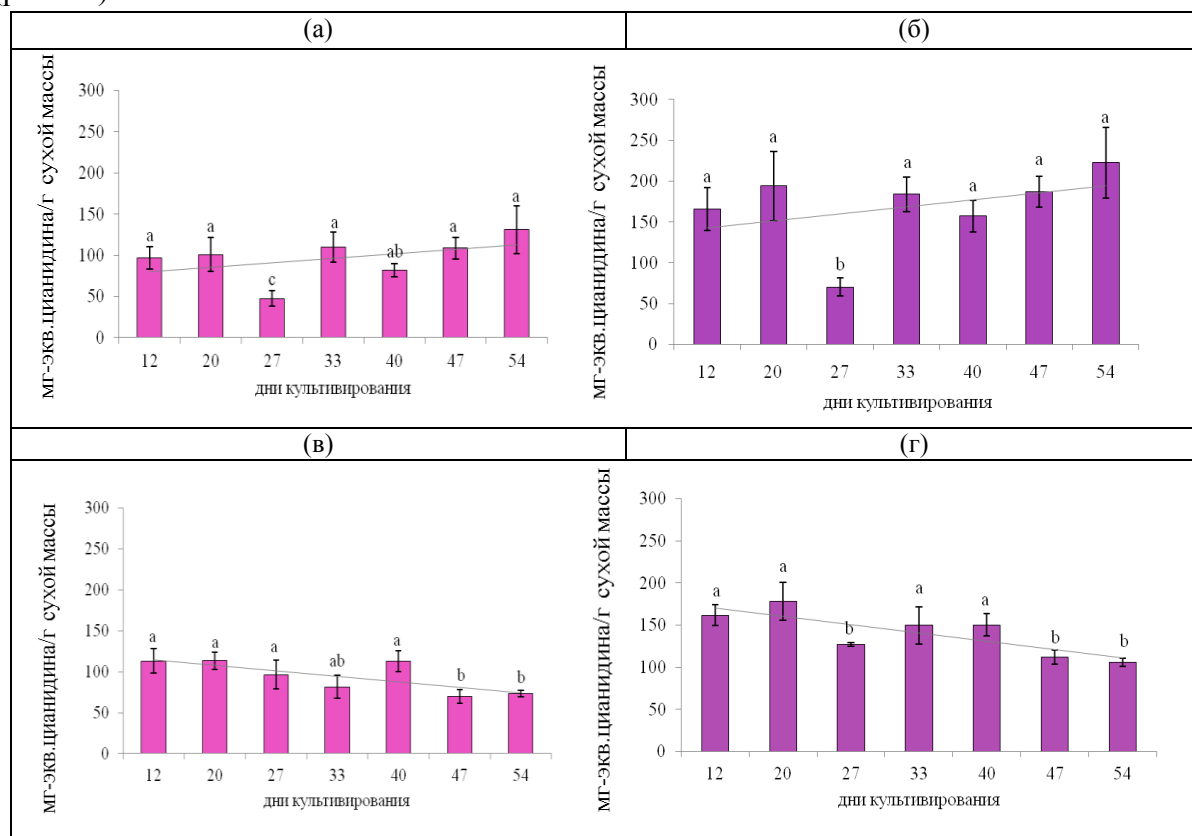


Рисунок 10. Изменения в содержании растворимых (а, в) и нерастворимых (б, г) проантоцианидинов в процессе роста каллусной культуры стебля чайного растения, выращиваемой в темноте (а,б) или на свету (в,г).

Следует также отметить, что в каллусных культурах чая количество связанных ПА в 1,5 раза превышало таковое растворимых их форм, что противоположно накоплению этих

соединений в интактных растениях. Способность клеток каллусной ткани чая накапливать большие количества олигомерных и полимерных ФЛ свидетельствует об изменениях в фенольном метаболизме и активации процессов полимеризации этих веществ по сравнению с интактными растениями. Это согласуется и с данными о том, что содержание растворимых ПА было сопоставимо с таковым у интактного растения, а накопление нерастворимых (связанных) форм - выше.

Определение активности ФАЛ показало практически равный ее уровень в каллусных культурах чайного растения, растущих в темноте и перенесенных в световые условия (рис. 11). При этом он был ниже, чем в интактном растении, что возможно, и объясняет более низкую способность каллусных тканей к образованию ФС.

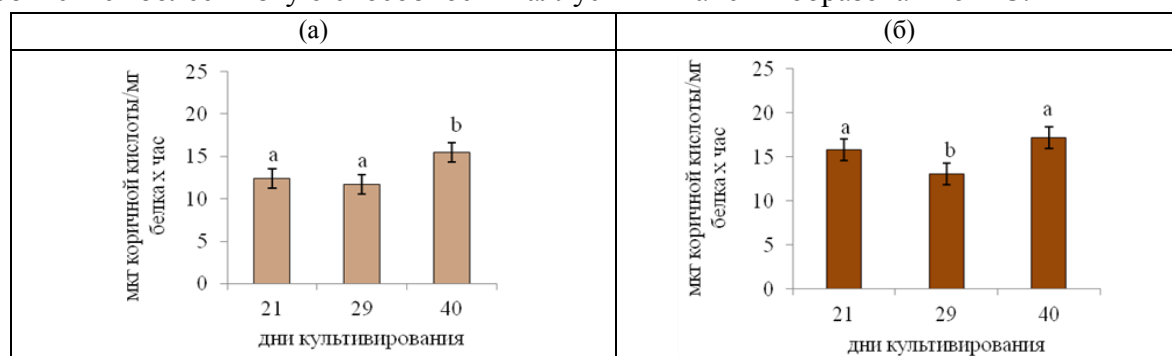


Рисунок 11. Изменения в активности L-фенилаланинаммиаклиазы в процессе роста каллусных культур стебля чайного растения, выращиваемых в темноте (а) или на свету (б).

Все вышеизложенное свидетельствует об активации светом накопления ФЛ на начальных этапах культивирования каллусов чая, и этот эффект не зависел от активности ключевого фермента фенольного метаболизма - ФАЛ.

### 3. Влияние кадмия на каллусные культуры чайного растения, выращиваемые в темноте или на свету

Кадмий это один из наиболее токсичных тяжелых металлов, способных вызывать развитие окислительного стресса в растительных клетках (Серегин, Иванов, 2001; Fryzova et al., 2017). В этом случае важная роль отводится антиоксидантной системе защиты, включающей ФС, в том числе ФЛ, ингибирующие процессы радикально-цепного окисления (Edreva et al., 2008; Тараховский и др., 2013; Stagos, 2020).

Выращивание каллусов чая на среде с Cd вызывало некоторые изменения в их морфологии. Они становились менее плотными и приобретали более темный оттенок к концу пассажа. В присутствии поллютанта у темновой культуры отмечалось снижение прироста биомассы, что в меньшей степени проявлялось у культуры, выращиваемой на свету (рис.12).

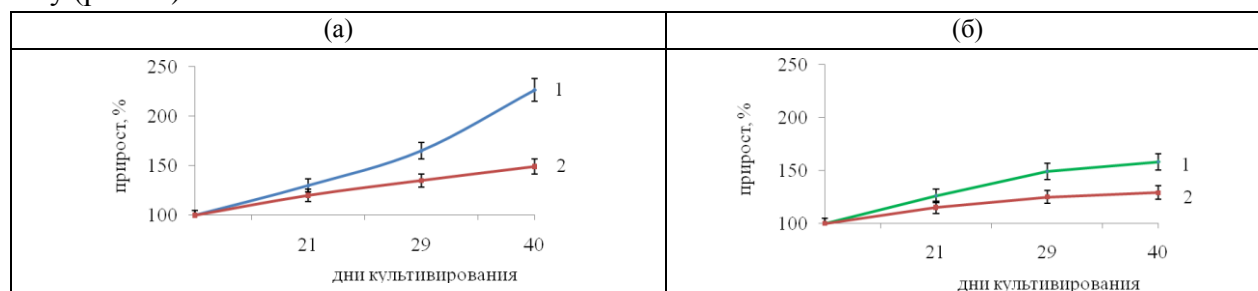


Рисунок 12. Динамика роста каллусных культур стебля чайного растения, выращиваемых в темноте (а) или на свету (б) на основной питательной среде (1) или на среде с кадмием (2).

Оводненность у обеих культур чая в течение всего пассажа как в контрольном, так и в опытном варианте изменялась незначительно и составляла 92-94%.

Традиционно ответ клеток на экзогенное воздействие различных факторов оценивают по содержанию МДА. У культуры чая, выращиваемой в темноте, в присутствии Cd уровень МДА был ниже, чем в контроле, тогда как в световой культуре в большинстве случаев - выше, что говорит о наличии у нее выраженной стрессовой реакции (рис. 13).

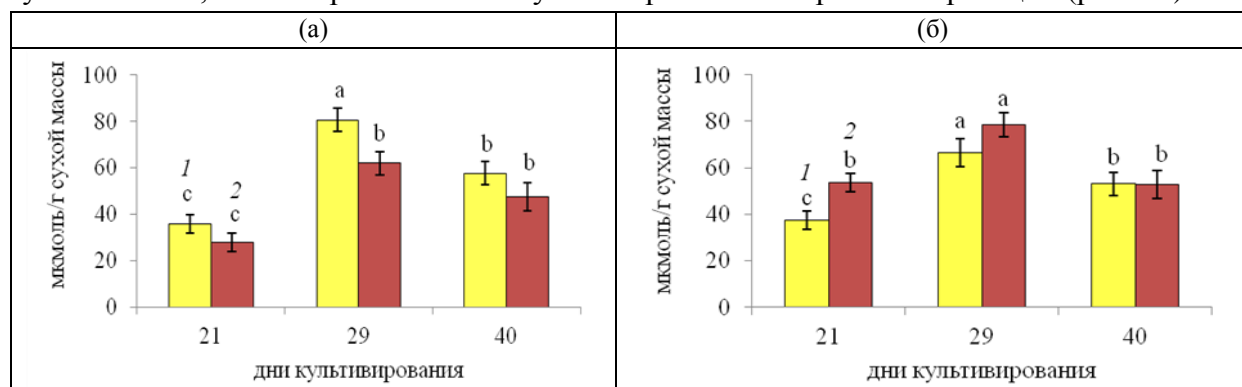


Рисунок 13. Изменения в содержании малонового диальдегида в каллусных культурах стебля чайного растения, выращиваемых в темноте (а) или на свету (б) на основной питательной среде (1) или на среде с кадмием (2).

Это свидетельствует о различной реакции каллусных культур чая, выращиваемых в темноте и на свету, на действие Cd.

Исследование содержания ФЛ показало, что в каллусах, выращиваемых в темноте на основной питательной среде, их содержание по мере роста снижалось, тогда как на среде с Cd – возрастало и к концу пассажа превышало значения контроля в 3 раза (рис. 14).

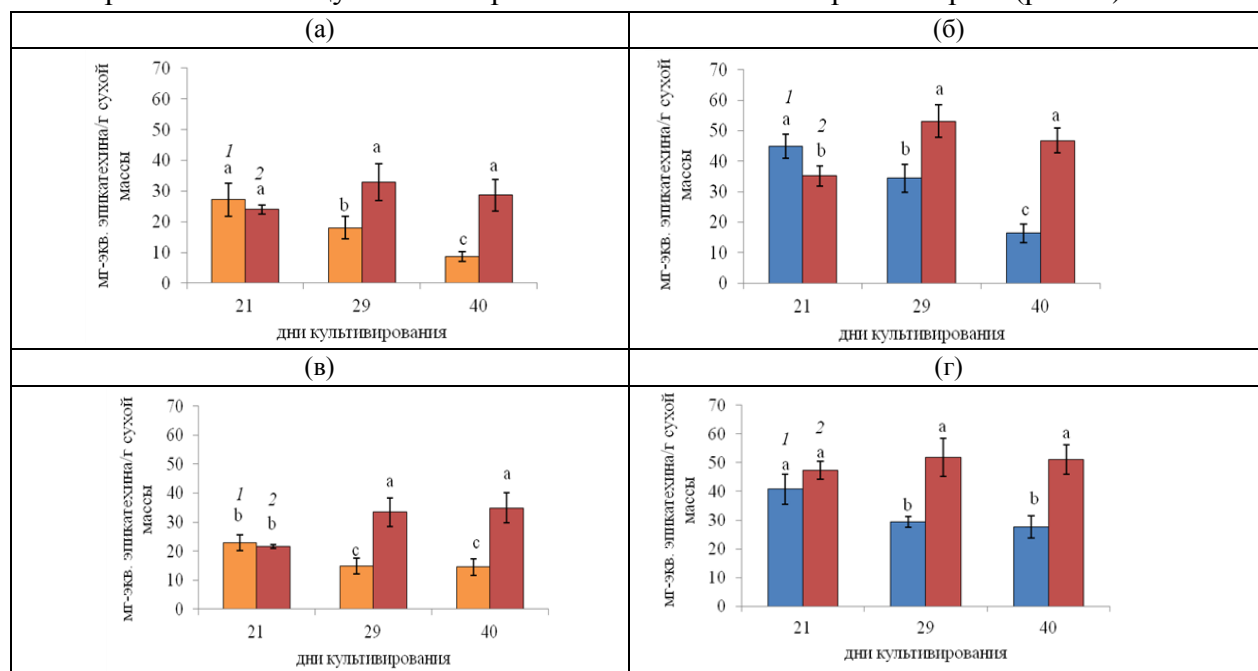


Рисунок 14. Изменения в содержании флаванов (а, в) и суммы фенольных соединений (б, г) в процессе роста каллусной культуры стебля чайного растения, выращиваемой в темноте (а,б) и на свету (в,г) на основной питательной среде (1) или на среде с кадмием (2).

Культура чая, выращиваемая на свету, по способности к накоплению ФЛ была близка к культуре, выращиваемой в темноте, как в контрольном, так и в опытном вариантах (рис. 14 в). В присутствии Cd среде их количество в конце пассажа было почти в

2 раза выше, чем в контрольном варианте, при условии равного их содержания на начальных этапах роста.

Для суммарного накопления ФС в этих двух культурах чая, выращиваемых на стандартной среде и на среде с Cd, были аналогичны таковым накопления ФЛ (рис.14 б, г). Следовательно, на среде с экотоксикантом (Cd) содержание как суммы ФС, так и основных компонентов фенольного комплекса каллусных культур чая – ФЛ - повышалось, что свидетельствует об их важной роли в системе защиты клеток от его действия.

Что касается как растворимых, так и связанных форм ПА, то в опытном варианте их содержание не увеличивалось, как в случае ФЛ, а либо не изменялось (темновая культура), либо незначительно снижалось (световая культура) в процессе роста (рис.15).

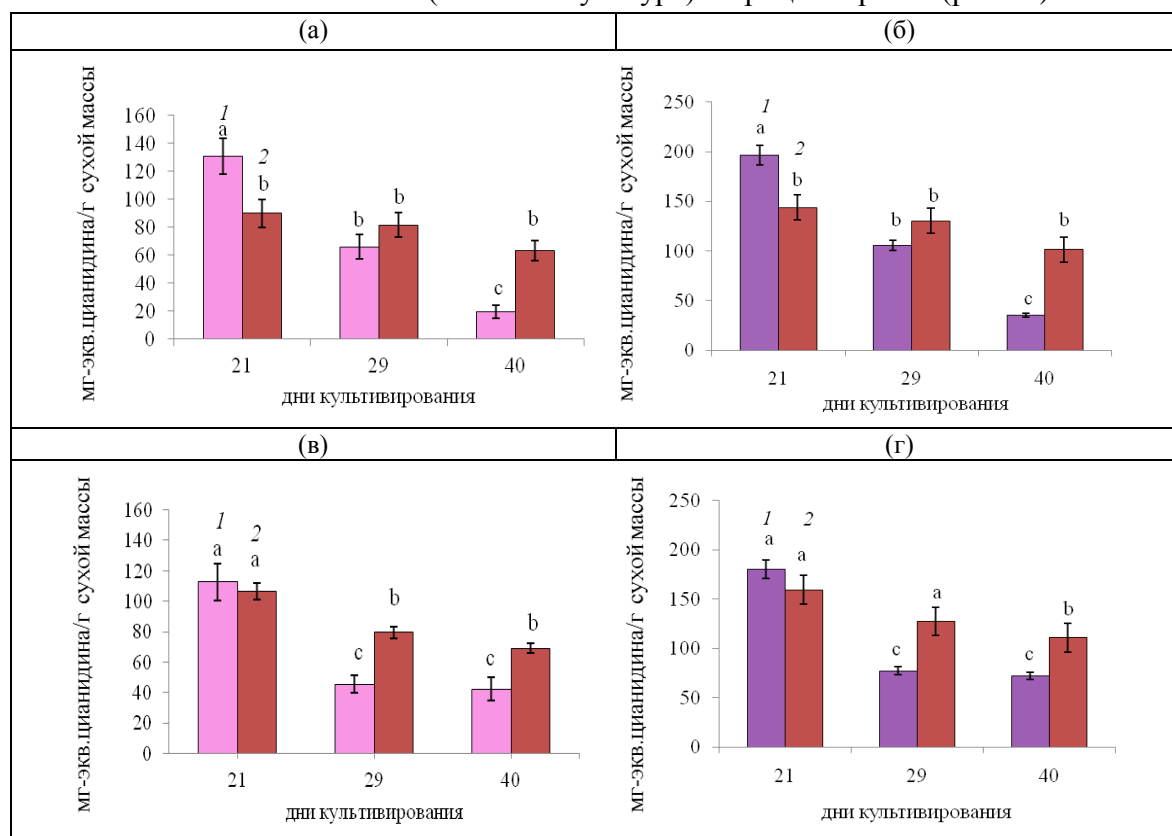


Рисунок 15. Изменения в содержании растворимых (а, в) и нерастворимых (б, г) проантоцианидинов в процессе роста каллусных культур стебля чайного растения, выращиваемых в темноте (а, б) или на свету (в, г) на основной питательной среде (1) или на среде с кадмием (2).

При этом к окончанию цикла культивирования их накопление на среде с Cd было выше, чем в контроле как у темновой, так у световой культур (на 60 и 30% соответственно).

Определение активности ФАЛ в культурах чая, выращиваемых в темноте или на свету, показало незначительные отличия между контрольными и опытными вариантами (рис. 16). Можно отметить ее противоположные изменения: у темновой культуры – повышение, у световой – снижение, что в большей степени было выражено на начальных этапах их роста.

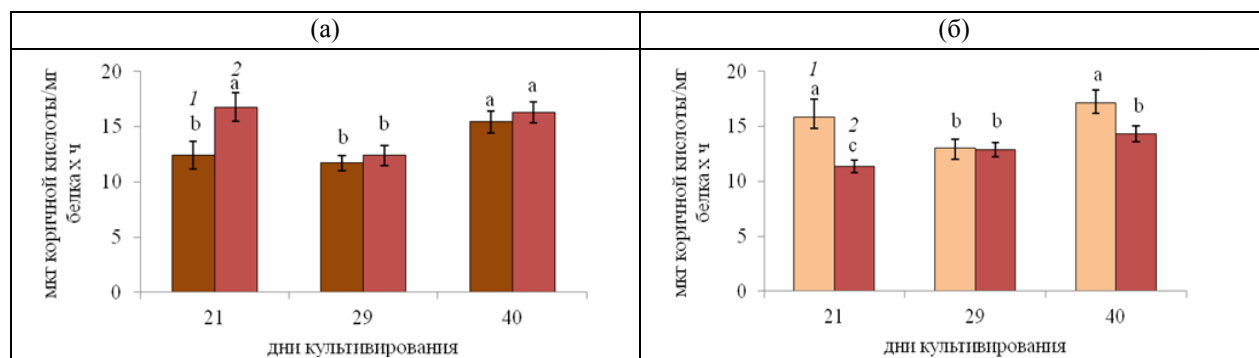


Рисунок 16. Изменения в активности *L*-фенилаланинаммиаклиазы в процессе роста каллусных культур стебля чайного растения, выращиваем в темноте (а) или на свету (б) на основной питательной среде (1) или на среде с кадмием (2).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету на среде с Cd, к середине пассажа происходило увеличение суммарного содержания ФС, в том числе ФЛ, хотя накопление ПА снижалось относительно контроля. Исходя из того, что флавановый комплекс каллусных культур чайного растения представлен их мономерами (катехины) и олигомерами (ПА), можно предположить, что в условиях действия Cd в них в большей степени повышалось накопление именно катехинов, и в меньшей степени ПА, что согласуется с данными других исследователей об антиоксидантных свойствах катехинов (Higdon, Frei, 2003; Wei et al., 2011; Grzesik et al., 2018).

#### 4. Влияние пероксида водорода на каллусные культуры чайного растения, выращиваемые в темноте или на свету

Еще одним экзогенным соединением, влияющим на метаболизм растительных клеток, является пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), рассматриваемый как сигнальная молекула, так и стрессовый фактор (Креславский и др., 2012; Fedurayev et al., 2018; Sachdev et al., 2021).

Выдерживание каллусов чая, выращиваемых в темноте или на свету, в растворе  $H_2O_2$  в течение 2 час практически не влияло на их морфологические характеристики (рис. 17). Последующее их перенесение на основную питательную среду и культивирование в течение 48 час для изучения последствий  $H_2O_2$  также не приводило к заметным изменениям в морфологии каллусов, хотя они приобретали более темный оттенок.

Условия выращивания	Контроль	I	II
Темнота			
Свет			

Рисунок 17. Внешний вид каллусных культур стебля чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету и выдержанных в воде (контроль) или водном растворе  $H_2O_2$  ( $1 \times 10^{-4}$  М). Варианты: I – кратковременное воздействие  $H_2O_2$  (2 часа); II – последствие  $H_2O_2$  (через 48 часов). Возраст культуры – 24 дня.

Определение оводненности каллусов чая, выращиваемых в темноте и подвергнутых действию  $H_2O_2$ , показало ее снижение относительно контроля (91-92% и 93-94%, соответственно). В каллусах, выращиваемых на свету, эта тенденция отмечалась лишь у 24-дн. культуры через 48 час после воздействия  $H_2O_2$  (с 95% до 89 %). В остальных вариантах она либо не изменялась, либо даже слегка увеличивалась.

Таким образом, кратковременное воздействие  $H_2O_2$  ( $1 \times 10^{-4}$  М) не приводило к изменению морфологии каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте и на свету, хотя влияло на их оводненность, в большинстве случаев снижая ее.

Определение содержания МДА в каллусах чая показало более высокий его уровень как у темновой так и у световой культур более позднего срока пассирования (рис. 18).

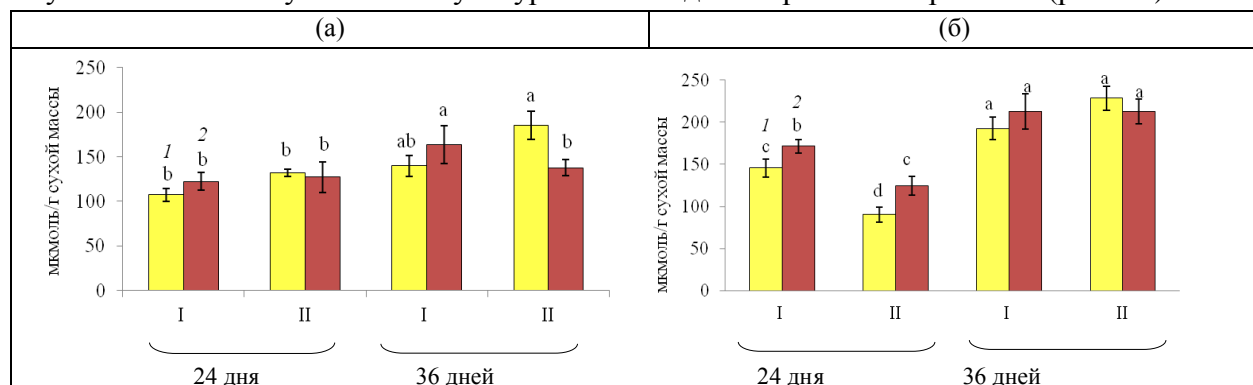
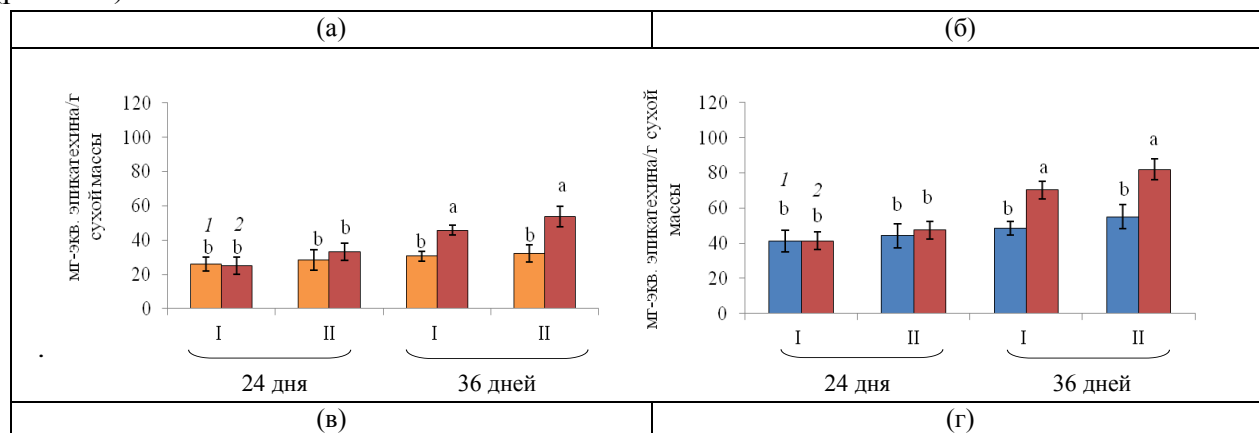


Рисунок 18. Содержание малонового диальдегида в каллусных культурах стебля чайного растения различного возраста, выращиваемых в темноте (а) или на свету (б) и выдержанных в воде (1) или водном растворе  $H_2O_2$  (2). Варианты: I – кратковременное воздействие  $H_2O_2$  (2 часа); II – последствие  $H_2O_2$  (через 48 час.)

При этом в большинстве случаев в опытных вариантах культур различного возраста оно было либо равно, либо выше такового в контроле. Лишь у 36-дневного темнового каллуса через 48 час после воздействия  $H_2O_2$ , отмечено снижение содержания МДА, что может свидетельствовать об активации систем защиты (рис. 18а).

Что касается ответа клеток на действия  $H_2O_2$  на уровне накопления ФЛ, то у выращиваемой в темноте 24-дневной культуры его не наблюдалось, тогда как у 36-дневной - отмечалась быстрая реакция, которая выражалась в увеличении их содержания уже после 2-час воздействия (рис. 19а). Аналогичная тенденция была характерна и для суммы ФС (рис. 19б).





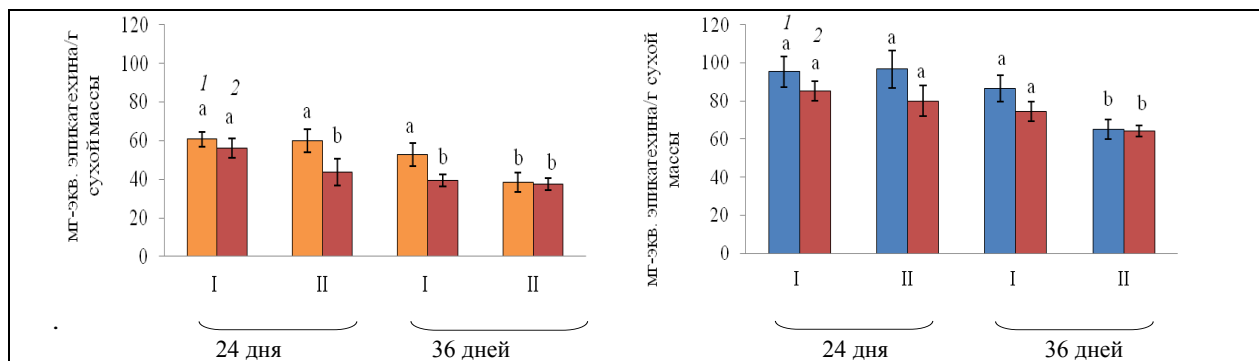


Рисунок 19. Содержание флаванов (а, в) и суммы фенольных соединений (б, г) в каллусных культурах стебля чайного растения различного возраста, выращиваемых в темноте (а, б) или на свету (в, г) и выдержанных в воде (1) или водном растворе  $H_2O_2$  (2). Варианты: I – кратковременное воздействие  $H_2O_2$  (2 часа); II – последствие  $H_2O_2$  (через 48 час.)

У культуры чая, выращиваемой на свету, выраженного «флаванового» ответа на воздействие  $H_2O_2$  ни в одном случае отмечено не было (рис. 19в). Во всех вариантах содержание ФЛ в опыте было либо равным таковому в контроле, либо несколько ниже (на 10-15%). Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении суммарного содержания ФС (рис. 19г). Следовательно, ни прямое действие  $H_2O_2$ , ни его «последствие» не оказывало эффекта на накопление ФС, в том числе ФЛ, в культуре чая, растущей на свету, что может быть обусловлено их исходно высоким эндогенным уровнем.

В содержании как растворимых, так и нерастворимых ПА прослеживалась тенденции в определенной степени аналогичные таковым по содержанию ФЛ (рис. 20).

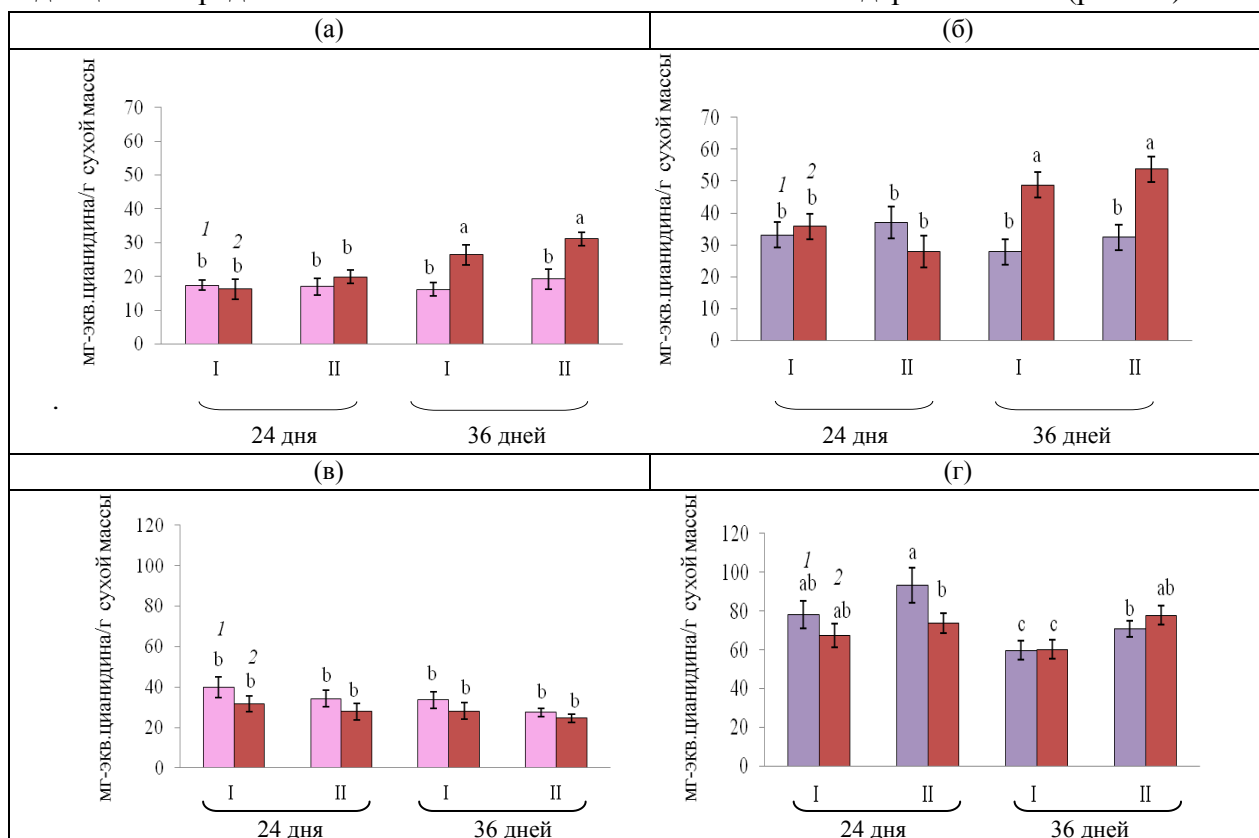


Рисунок 20. Содержание растворимых (а, в) и нерастворимых (б, г) проантоцианидинов в каллусных культурах стебля чайного растения различного возраста, выращиваемых в темноте (а, б) или на свету (в, г) и выдержанных в воде (1) или водном растворе  $H_2O_2$  (2). Варианты: I – кратковременное воздействие  $H_2O_2$  (2 часа); II – последствие  $H_2O_2$  (через 48 час.)

В культурах чая различного возраста, выращиваемых в темноте, значительных изменений в содержании ПА после воздействия  $H_2O_2$  не отмечено, за исключением накопления нерастворимых ПА в 24-дневных каллусах, у которых оно уменьшалось через 48 час после воздействия  $H_2O_2$  по сравнению с первоначальным уровнем и было ниже, чем в контрольном варианте. Примечательно, что в целом содержание этих форм флаванов в культурах чайного растения обоих возрастов, культивируемых в темноте, было почти в 2 раза выше, чем растворимых их форм.

В каллусных культурах чая, выращиваемых на свету, содержание как растворимых, так и связанных ПА было выше в 1,5 и более чем в 2,5 раза, соответственно, нежели в культурах, растущих в темноте. Аналогично ФЛ, количество растворимых ПА в каллусах обоих возрастов, выращиваемых на свету, при действии  $H_2O_2$  практически не изменялось (рис.20в). Ответная реакция клеток на действие  $H_2O_2$  в большей степени проявлялась в отношении накопления связанных форм ПА (рис. 20г). Так, у 36-дневных каллусов чая, выращиваемых на свету, оно было сопоставимо в контрольном и опытном вариантах. Однако через 48 час после воздействия накопление нерастворимых ПА достоверно повышалось, то есть обнаруживался «постэффект» действия  $H_2O_2$ .

Все вышеизложенное позволяет заключить, что изменения в накоплении ПА в клетках каллусных культур чайного растения в условиях действия  $H_2O_2$  во многом схож с таковым ФЛ. Это сходство обнаруживается преимущественно на уровне накопления растворимых их форм и в меньшей степени – нерастворимых. Отсюда следует, что в образовании нерастворимых форм ПА участвуют отличные от классической схемы процессы. Решение этой проблемы на сегодняшний день представляет большой интерес для исследователей (Jonker, Yu, 2017; Dixon, Sarnala, 2020).

К числу ферментов, участвующих в нейтрализации АФК в клетках растений относятся пероксидазы, которым отводится и важная роль в процессах олигомеризации и полимеризации ПА (Miller et al., 2010; Noctor et al., 2015). Нами была проанализирована активность гваякол-зависимой пероксидазы (ПО), восстанавливающей  $H_2O_2$  за счет окисления гваякола.

В каллусах чая разного возраста, выращиваемых в темноте и на свету, активность ПО значительно изменялась в зависимости от времени действия стрессора (рис. 25). При этом в целом, в темновых каллусах, она была значительно выше таковой на свету.

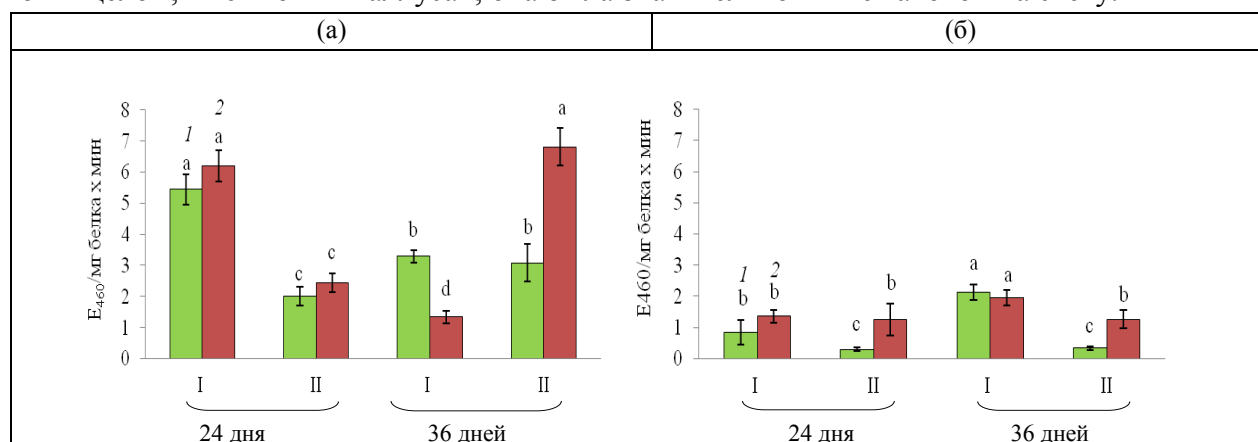


Рисунок 21. Активность растворимой гваякол-зависимой пероксидазы в каллусных культурах стебля чайного растения различного возраста, выращиваемых в темноте (а) или на свету (б) и выдержанных в воде (1) или водном растворе  $H_2O_2$  (2). Варианты: I – кратковременное воздействие  $H_2O_2$  (2 часа); II – последствие  $H_2O_2$  (через 48 час.)

У каллусных культур, выращиваемых в темноте, после 2 час воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 24-дневную культуру активность фермента была сопоставимой с таковой в контроле, а через 48 час в обоих вариантах она снижалась почти в 3 раза. Иной ответ отмечен у 36-дневной культуры: после 2 час воздействия в опытном варианте она была ниже, чем в контроле, тогда как через 48 час в опытном варианте она возросла в 5 раз, а в контрольном оставалась на прежнем уровне. Следовательно, воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на каллусы чая, выращиваемые в темноте, первоначально вызывало снижение активности ПО, а в значительное ее увеличение, что свидетельствует о ярко выраженном ответе клеток на это воздействие. Примечательно, для этого периода характерно увеличение количества ФЛ и ПА в культуре чая, тогда как уровень ПОЛ незначительно снижался.

Что касается культур чая, выращиваемых на свету, то в большинстве случаев активность ПО в них была довольно низкой (рис. 21б). При этом уровень накопления в них ФЛ, ПА и интенсивность ПОЛ были выше, чем в темновой культуре.

В целом, полученные нами данные по изучению действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на каллусные культуры чайного растения различного возраста, выращиваемые в темноте или на свету, свидетельствуют о разнообразной их ответной реакции, которая зависит от возраста культуры, условий культивирования, а также времени изучения о (быстрый и отдаленный эффект).

## 5. Состав флаванов и других фенольных соединений каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте или на свету и его изменения при действии экзогенных факторов

Известно, что в условиях *in vitro* состав ФС клеток чайного растения изменялся по сравнению с таковым исходных эксплантов, хотя способность к образованию ФЛ сохранялась (Загоскина и др., 1994; Wang, 2012; Sutini, 2017). При этом имеется не так много сведений о фенольных метаболитах этих культур, выращиваемых в различных условиях (свет, темнота) и его изменений при экзогенных воздействиях.

В экстрактах каллусных культур чая, выращиваемых в темновых и световых условиях, было идентифицировано 19 ФС (табл. 2). Их состав был одинаков, но отличился по накопления отдельных их представителей.

Таблица 2. Хроматографические характеристики фенольных соединений каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте и на свету

№	Время удерживания, мин.	Максимумы УФ-спектров, нм	Масс-спектрометрические данные: m/z фрагменты		Моноизотопная масса, Да	Идентифицированное соединение
			[M-H] <sup>-</sup>	Другие		
1	2,18	314	315,07	631,15 [2M-H] <sup>-</sup>	316,08	Гексозид 2,5-дигидроксибензойной кислоты
2	2,27	277	331,07		332,08	Галлоил глюкоза
3	2,41	309	315,07		316,08	Гексозид 2,3-дигидроксибензойной кислоты
4	2,78	277-280	577,14	1155,28 [2M-H] <sup>-</sup>	578,14	ПА-димер Б типа (изомер 1)
5	2,82	288	299,08	599,16 [2M-H] <sup>-</sup>	300,08	Гексозид салициловой кислоты

6	2,92	277-280	289,07		290,08	(+)-катехин
7	2,94	277-280	483,08		484,09	Дигаллоил глюкоза
8	2,99	277-280	451,13		452,13	Гексозид эпикатехина
9	3,09	277-280	865,20		866,21	ПА-тример Б типа (изомер 1)
10	3,17	277-280	865,20		866,21	ПА-тример Б типа (изомер 2)
11	3,24	277-280	577,14	1155,28 [M-H] <sup>-</sup>	578,14	ПА-димер Б типа (изомер 2)
12	3,35	277-280	289,07		290,08	(-)-эпикатехин
13	3,43	277-280	1153,26	576,13 [M-2H] <sup>2-</sup>	1154,27	ПА-тетрамер Б типа (изомер 1)
14	3,50	277-280	1153,26	576,13 [M-2H] <sup>2-</sup>	1154,27	ПА-тетрамер Б типа (изомер 2)
15	3,52	278, 330, 344	755,21		756,21	Дигексозил-метилпентозид кемпферола
16	3,61	277-280	1441,33	720,16 [M-2H] <sup>2-</sup>	1442,33	ПА-пентамер Б типа (изомер 1)
17	3,64	277-280	865,20		866,21	ПА-тример Б типа (изомер 3)
18	3,76	277-280	1153,26	576,13 [M-2H] <sup>2-</sup>	1154,27	ПА-тетрамер Б типа (изомер 3)
19	3,84	277-280	1441,33	720,16 [M-2H] <sup>2-</sup>	1442,33	ПА-пентамер Б типа (изомер 2)

ФЛ были представлены 13 соединениями, что составило почти 70% от всего фенольного комплекса каллусов чайного растения, включая их мономерные и олигомерные соединения. К мономерным ФЛ относились (+)-катехин, (-)-эпикатехин и гексозид (-)-эпикатехина, который нами впервые был обнаружен в каллусной культуре чайного растения. При этом характерные для интактного растения чая галлированные формы катехинов отсутствовали, как это отмечалось и ранее (Загоскина, 1990).

Наряду с мономерами ФЛ, в экстрактах каллусных культур чайного растения были идентифицированы олигомерные их формы – ПА, в том числе с высокой степенью полимеризации (СП > 5) (табл. 3).

Таблица 3. Хроматографические характеристики полимерных процианидинов каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте и на свету.

№	Время удерживания, мин	Масс-спектрометрические данные: m/z фрагменты		Моноизотопная масса, Да	Степень полимеризации процианидина (СП)
		[M-2H] <sup>2-</sup>	[M-3H] <sup>3-</sup>		
1	3,94			1730,4	СП6
2	4,03	1008,23		2018,47	СП7
3	4,1	767,84		2306,54	СП8
4	4,22		959,88	2882,66	СП10
5	4,27		1055,9	3170,72	СП11
6	4,31		1247,95	3746,87	СП13
7	4,44		1343,96	4034,90	СП14

Они были представлены ПА Б типа с различной степенью полимеризации: два изомера ПА димерной структуры (соединения 4, 11), три изомера - тримерной структуры (соединения 9, 10, 17), три изомера тетрамерной структуры (соединения 13, 14, 18) и два – пентамерной структуры (соединений 16, 19). Использование для анализа ПА определения по их многозарядным ионам (Lerrä et al., 2018; Li et al., 2020) позволило обнаружить (после 4 минут разделения на колонке) семь процианидиновых полимеров Б-типа, образующих двухзарядные (СП 6-8) и трехзарядные ионы (СП 10, 11, 13 и 14) (табл. 3).

Помимо различных ФЛ в этанольных экстрактах каллусных культур чая были идентифицированы пять ФС (соединения 1, 2, 3, 5, 7), относящихся к классу оксibenзойных кислот (табл. 2). Были идентифицированы галлоилглюкоза (2) и дигаллоилглюкоза (7). Соединения 1 и 3 имели одинаковые моноизотопные массы и предположительно были идентифицированы как изомеры гексозидов дигидроксибензойной кислоты. Использование данных МС/МС-фрагментации и анализа ионов выявило различия между ними и установило их принадлежность к гексозидам 2,5-дигидроксибензойной (1) и 2,3-дигидроксибензойной (3) кислот. Соединение 5 по данным УФ- и МС- профилей было идентифицировано как гексозид салициловой кислоты. Образование гексозидов 2,5- и 2,3-дигидроксибензойной кислот, а также салициловой кислот впервые установлено в каллусной культуре чая.

Для чайного растения характерно образование флавонолов (Чхиквишвили, 1997; Morlok et al., 2021). Анализ УФ, МС и МС/МС данных показал, что в полученных из него каллусных культурах присутствовал только дигексозил-метилпентозид кемпферола (соединение 15; табл. 2). Примечательно, что ранее производные кемпферола были идентифицированы только в культуре чая, выращиваемой на свету (Загоскина, 1990).

Таким образом, ФС, обнаруженные в экстрактах каллусных культур чая, можно разделить на 3 группы: флаваны (катехины и ПА), производные оксibenзойных кислот и флавонолов. Важно отметить что, ФЛ и флавонолы относятся к самому многочисленному и широко распространенному в природе классу ФС – флавоноидам (Запрометов, 1990; Тараховский и др., 2003; Liu et al., 2021).

Расчет относительного содержания ФЛ показал, что у обоих типов культур преобладающим соединением являлся (-)-эпикатехин. Содержание катехина было не столь высоким, особенно в темновой культуре. Следовательно, свет положительно влиял на накопление отдельных представителей мономерных ФЛ. Что касается ПА, то среди них преобладали тримеры и димеры. Содержание остальных олигомеров было не столь значительным. При этом на свету количество ПА в каллусах на 30 – 40% превышало таковое в темноте.

Следовательно, состав ФС каллусных культур чая в основном менее разнообразен, по сравнению с таковым интактного растения, за исключением ПА, для которых характерно расширение их спектра за счет возрастания степени полимеризации. При действии света, несмотря на "постоянство" фенольного комплекса каллусных культур, выращиваемых в темноте и на свету, содержание отдельных его метаболитов изменялось: увеличивалась доля «флавановых» и уменьшалась доля «нефлавановых» компонентов.

Что касается влияния экзогенных факторов, то ни выращивание каллусов на среде с Cd, ни их обработка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не приводили к изменению качественного состава ФЛ, лишь незначительно менялось содержание некоторых их компонентов. Так, при воздействии Cd как на темновую, так и на световую культуры происходило увеличение содержания эпикатехина и катехина, при этом на накопление ПА практически не влияло. При

обработке выращиваемых на свету каллусов  $H_2O_2$  и последующем культивировании этих каллусов на питательной среде, значительных изменений в содержании ни мономерных ни олигомерных форм ФЛ не происходило.

В целом же, полученные нами данные по изучению действия экзогенных стрессоров на клетки каллусных культур чайного растения, выращиваемых в темноте и на свету свидетельствуют о том, что клеточный ответ в большей степени проявляется на уровне суммарного накопления ФЛ, нежели отдельных метаболитов фенольного комплекса и зависит от возраста культур и длительности воздействия стрессора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на активное исследование метаболизма ФС, в том числе ФЛ, и их роли в жизнедеятельности растений, до сих пор остаются невыясненными некоторые вопросы, связанные с особенностями их образования, регуляции и накопления в условиях *in vivo* и *in vitro*. Для их изучения удобным объектом являются фенолнакапливающие растения, в том числе *Camellia sinensis* L., а также инициированные из него клеточные культуры, сохраняющие способность к образованию ФС, преимущественно ФЛ (Запрометов, 1979; Загоскина и др., 1994, 2000, 2003; Kerio et al., 2013; Zhao et al., 2017).

Изучение особенностей накопления ФЛ в молодых побегах (флешах) чайного растения показало, что несмотря на то, что в их листьях и стеблях количество этих метаболитов практически равно, однако их доля от суммарного содержания ФС в стеблях выше, чем в листьях. Вероятно, это обусловлено накоплением в них олигомерных ПА (преимущественно растворимых форм), содержание которых в молодых флешах чая значительно.

Инициация культур *in vitro* из эксплантов листьев и стеблей флешей растений чая сопровождалась снижением их биосинтетической способности в отношении образования ФЛ, что в меньшей степени проявлялось у культуры стебля. При этом в каллусных культурах образование растворимых ПА сохранялась на уровне интактного растения, а нерастворимых (связанных с клеточными стенками) даже возрастало. Все это делает культуру чая еще более привлекательной для исследований в области изучения фенольного метаболизма, поскольку особенности образования и накопления связанных форм ПА до сих пор остаются невыясненными (Ossipova, 2001; Zhao, 2015; Dixon, Sarnala, 2020).

В нашем случае для изучения регуляции образования ФЛ, в том числе их олиго- и полимерных форм – ПА, в клетках растений использовали воздействие на каллусы чая различных экзогенных факторов (свет, Cd,  $H_2O_2$ ). Установили, что перенесение каллусных культур чая в условия освещения замедляло их рост и приводило к активации накопления ФЛ, что проявлялось как в увеличении их суммарного содержания, так и содержания отдельных их представителей – (-)-эпикатехина, (+)-катехина и в меньшей степени растворимых ПА различной степени полимеризации. При этом изменений в накоплении нерастворимых форм ПА не отмечалось. Присутствие Cd в питательной среде при выращивании каллусных культур чая как в темноте, так и на свету влияло на их морфофизиологические характеристики, что проявлялось в потемнении каллусов, формировании на их поверхности некротических участков и снижении прироста. Вместе с тем отмечалась постепенная активация накопления ФЛ, что в большей степени проявлялось на завершающих этапах роста культур. Кратковременное воздействие  $H_2O_2$  практически не влияло на морфофизиологию каллусов, выращиваемых в темноте и на свету, и образование в них ФЛ, за исключением темновой культуры более позднего срока

пассирования. В последнем случае содержание этих метаболитов, в том числе растворимых и нерастворимых форм ПА, повышалось, на фоне увеличения активности гваякол-зависимой пероксидазы.

В целом, полученные нами данные по изучению действия экзогенных факторов на каллусные культуры чайного растения различного возраста, выращиваемые в темноте или на свету, свидетельствуют о разнообразной ответной реакции растительных клеток, которая зависит от возраста культуры, условий культивирования, а также длительности действия стрессового фактора.

Следует также отметить, что как в тканях растений чая, так и в инициированных из них каллусных культурах уровень накопления ФС не зависел от активности ключевого фермента их биосинтеза – L-фенилаланинаммиаклиазы. Это может быть обусловлено как каталитическим потенциалом самого фермента, так и количеством доступного L-фенилаланина – основного их прекурсора.

Исследование состава флаванового комплекса расширило представления о биосинтезе в *in vitro* культурах чайного растения. Впервые в них был идентифицирован гексозид (-)-эпикатехина, а также гексамеры проантоцианидиновой природы (ранее обнаруживали проантоцианидины с максимальной степенью полимеризации, равной 5). Кроме того, было показано, что воздействие экзогенных факторов не вызывало изменений в составе флаванового комплекса каллусной культуры чая и практически не влияло на накопление его отдельных представителей.

Все вышеизложенное подтверждает факт отличий в образовании вторичных метаболитов, в частности ФЛ, в условиях *in vivo* и *in vitro* (на примере клеток чайного растения). Получены данные, свидетельствующие об изменениях в их биосинтезе в каллусных культурах чая, в частности «новообразовании» соединений, ранее не идентифицированных в интактных растениях. Несомненным приоритетом работы является выяснение закономерностей образования и состава мономерных и полимерных форм ФЛ в клетках высших растений, в том числе в условиях действия различных экзогенных факторов.

## ВЫВОДЫ

1. В листьях побегов чая (*Camellia sinensis* L.) накопление проантоцианидинов было ниже по сравнению со стеблями, тогда как общее содержание флаванов было одинаковым и не зависело от активности ключевого фермента фенольного метаболизма - L-фенилаланинаммиаклиазы, которая была у них равной.
2. В каллусных культурах, инициированных из стебля и листа побегов чая, количество флаванов было ниже, чем в исходных эксплантах (особенно у листового каллуса), тогда как содержание проантоцианидинов не изменялось.
3. Перенесение каллусной культуры стебля чайного растения из темновых в световые условия выращивания сопровождалось снижением ее роста, активацией накопления флаванов, отсутствием изменений в содержании проантоцианидинов и активности L-фенилаланинаммиаклиазы.
4. Наличие ионов кадмия ( $6,3 \times 10^{-5} \text{M}$ ) в питательной среде снижало прирост каллусов чая, выращиваемых в темноте или на свету, незначительно изменяя содержание в них малонового диальдегида и активности L-фенилаланинаммиаклиазы, на фоне увеличения количества флаванов и проантоцианидинов, что в большей степени проявлялось на завершающих этапах их роста, особенно у гетеротрофной культуры.

5. Кратковременное воздействие  $H_2O_2$  ( $1 \times 10^{-4} M$ ) в большинстве случаев не влияло на накопление флаванов, включая проантоцианидины, в каллусных культурах чая, выращиваемых в темноте или на свету, за исключением гетеротрофного каллуса более позднего срока выращивания (36 суток), у которого их содержание повышалось на фоне увеличения активности гваякол-зависимой пероксидазы.
6. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии показано, что флаваны каллусных культур стебля чайного растения представлены (-)-эпикатехином, (+)-катехином, проантоцианидинами типа «Б» (ди-, три-, тетра-, пентамеры), а также впервые идентифицированным в ней гексозидом (-)-эпикатехина.
7. При воздействии ионов кадмия в каллусных культурах стебля чайного растения, выращиваемых в темноте или перенесенных в световые условия, увеличивалось количество (-)-эпикатехина и (+)-катехина, тогда как при воздействии пероксида водорода только (+)-катехина (биогенетически раннего представителя флаванов).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Zubova M. Y., Nechaeva T. L., Kartashov A. V., Zagoskina, N. V. (2020). Regulation of the phenolic compounds accumulation in the tea-plant callus culture with a separate and combined effect of light and cadmium ions. *Biology Bulletin*, 47(6), 593-604.
2. Зубова М. Ю., Николаева Т. Н., Нечаева Т. Л., Малюкова Л. С., Загоскина, Н. В. (2019). О содержании пигментов, фенольных соединений и антирадикальной активности молодых побегов чая (*Camellia sinensis* L.). *Химия растительного сырья*, (4), 249-257.
3. Зубова М. Ю., Нечаева Т. Л., Загоскина Н. В. (2019). Образование и компарментализация проантоцианидинов в *in vitro* культурах чайного растения. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, 15(4), 5-10.
4. Нечаева Т. Л., Зубова М. Ю., Загоскина Н. В. (2019). О сохранении специфики накопления фенольных соединений в инициированных из различных органов чая (*Camellia sinensis* (L.) o. Kuntze) культурах *in vitro*. *Субтропическое и декоративное садоводство*, (69), 150-156.
5. Зубова М. Ю., Осипов В. И., Загоскина Н. В. (2017). Рост и накопление полифенолов в культуре чайного растения в присутствии кадмия. *Субтропическое и декоративное садоводство*, (61), 149-154.

### Статьи в международных рецензируемых журналах:

6. Ossipov V., Zubova M., Nechaeva T., Zagoskina N., Salminen J. P. (2022). The regulating effect of light on the content of flavan-3-ols and derivatives of hydroxybenzoic acids in the callus culture of the tea plant, *Camellia sinensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 101, 104383.

### Материалы конференций:



7. Зубова М. Ю., Нечаева Т. Л., Загоскина Н. В. (2020). Регуляция накопления проантоцианидинов-биоантиоксидантов фенольной природы-в *in vitro* культурах *Camellia sinensis* L. в условиях действия пероксида водорода. В сборнике: *Биоантиоксидант*. материалы X Международной конференции, посвященной 105-летию со дня рождения академика Н.М. Эмануэля. Москва, 2020. С. 36-27.
8. Зубова М. Ю., Осипов В. И., Загоскина Н. В. (2018). Флавоноиды в *in vitro* культурах *Camellia sinensis*. В сборнике: Фенольные соединения: функциональная роль в растениях. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума. Ответственный редактор Н.В. Загоскина. 2018. С. 162-165.
9. Зубова М. Ю. (2018) Проантоцианидины клеточных стенок каллусных культур чайного растения (*Camellia sinensis* L.) // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018». М.: МАКС Пресс, 2018.
10. Зубова М. Ю., Осипов В. И., Загоскина Н. В. (2018). Флаван-3-олы в каллусных культурах *Camellia sinensis* L., выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Тезисы докладов XI Международной конференции. 23-27 сентября 2018. Минск, Медисонт, 2018. С. 78-79.